



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**CAIO HENRIQUE NASI DE BARROS**

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA: ESTUDO  
DE INTERAÇÕES COM BIOMOLÉCULAS E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

**CAMPINAS  
2017**

**CAIO HENRIQUE NASI DE BARROS**

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA: ESTUDO  
DE INTERAÇÕES COM BIOMOLÉCULAS E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de  
Química da Universidade Estadual de Campinas como  
parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de  
Mestre em Química na área de Química Orgânica.**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ljubica Tasic**

**Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida pelo aluno Caio  
Henrique Nasi de Barros e orientada pela Profa. Dra. Ljubica Tasic.**

**CAMPINAS  
2017**

**Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s):** CNPq, 134663/2015-2; FAPESP, 2015/12534-5

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Química  
Camila Barleta Fullin - CRB 8462

Barros, Caio Henrique Nasi de, 1992-  
B278s      Síntese e caracterização de nanopartículas de prata : estudo de interações com biomoléculas e atividade antimicrobiana / Caio Henrique Nasi de Barros. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Ljubica Tasic.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Nanopartículas de prata. 2. Cancro cítrico. 3. Xanthomonas axonopodis pv. citri. 4. Hesperidina. I. Tasic, Ljubica, 1970-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Synthesis and characterization of silver nanoparticles : study on interactions with biomolecules and antimicrobial activity

**Palavras-chave em inglês:**

Silver nanoparticles

Citrus canker

Xanthomonas axonopodis pv. citri

Hesperidin

**Área de concentração:** Química Orgânica

**Titulação:** Mestre em Química na área de Química Orgânica

**Banca examinadora:**

Ljubica Tasic [Orientador]

Pedro Paulo Corbi

Sandra Regina Ceccato Antonini

**Data de defesa:** 11-07-2017

**Programa de Pós-Graduação:** Química

## **BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra. Ljubica Tasic (Orientadora)

Profa. Dra. Sandra Regina Ceccato Antonini (UFSCar-Araras)

Prof. Dr. Pedro Paulo Corbi (IQ-UNICAMP)

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do(a) aluno(a).

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado defendida pelo aluno **CAIO HENRIQUE NASI DE BARROS**, aprovada pela Comissão Julgadora em 11 de julho de 2017.



## **Dedicatória**

*Dedico este trabalho à minha família; em especial meus pais e meus avós, que me ensinaram tudo que fui, sou e serei.*

## **Agradecimentos**

*Primeiramente, à Deus.*

*Agradeço ao meu pai Luís e minha mãe Marcia por sempre me mostrarem que fazer a coisa certa é difícil e incômodo, mas que não há nada que supere a leveza de uma consciência limpa.*

*Minha gratidão é enorme pela minha orientadora Buba, por sempre acreditar em mim, por toda a paciência, generosidade e por todos os ensinamentos científicos, profissionais e pessoais que levarei por toda a vida.*

*Não posso deixar de mencionar também meus colegas do Laboratório de Química Biológica: Stephanie, João, Danijela, Daniela, Guilherme, Lilian, Roney, Banny, Amanda, Mayra, Lucas, Tássia e Natália. Obrigado por terem me ajudado na minha evolução profissional e pessoal. Nada teria sido como foi sem vocês. Espero de coração que também possa ter tido uma contribuição (ainda que mínima) na vida de vocês.*

*Um agradecimento especial também aos alunos de iniciação científica que trabalharam comigo durante esse tempo: Willian e Bruna. Espero que eu tenha conseguido contribuir um pouco para a formação de vocês.*

*À todos os funcionários do IQ, minha gratidão e admiração incondicionais. Sempre alegres e dispostos a ajudar. Um obrigado especial ao Chico e à Cláudia Martelli; sem ela este trabalho nunca poderia ter sido realizado. Também não posso esquecer do pessoal da limpeza, eletrônica e vidraria, que muitas vezes passam despercebidamente, porém são fundamentais para o andamento das atividades do laboratório.*

*Finalmente, agradeço às agências financiadoras que possibilitaram a concretização do projeto, seja com a bolsa ou com recursos para a infraestrutura do laboratório: Fapesp (número de processo 2015/12534-5) e CNPq (número de processo 134663/2015-2).*

## Resumo

As nanopartículas de prata (AgNP) biogênicas, ou prata elementar na escala nanométrica obtidas de forma biogênica ou biomimética, possuem interessantes propriedades físico-químicas e elevada atividade antimicrobiana. Utilizando extratos aquosos da casca da laranja (*Citrus sinensis*) fresca ou seca, biossínteses dessas nanopartículas foram executadas com sucesso em 10-12 h. A síntese de AgNP a partir do extrato aquoso da casca de laranja fresca teve um rendimento maior (83%), sendo que as AgNP foram estabilizadas por proteínas desse extrato e que posteriormente foram identificadas por espectrometria de massas (UPLC-MS/MS). Essas AgNP apresentaram diâmetros médios de  $48,1 \pm 20,5$  nm e potencial zeta ao redor de -20 mV. Também, por síntese química e biomimética, utilizando produtos naturais extraídos da casca de laranja, hesperidina (agente redutor) e nanocelulose (agente estabilizante), foram obtidas AgNP estáveis e uniformes. Suas propriedades, diâmetro médio e potencial zeta, foram de  $25,4 \pm 12,5$  nm e de -30 mV, respectivamente. Um filme na base de fibras de nanocelulose foi impregnado com as AgNP obtidas por via química, resultando num papel de nanocelulose e nanoprata. Todas as AgNP (três tipos) apresentaram efeitos bacteriostáticos e bactericidas contra a *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac cepa 306), o fitopatógeno responsável pela doença do cancro cítrico em plantações de laranja, em concentrações de 20-30 µg/mL. Finalmente, uma formulação de agroquímico contendo as AgNP foi proposta, viabilizando então futuros testes em plantações de laranja afetadas pelo cancro cítrico.

## Abstract

Biogenic silver nanoparticles (AgNPs) or elemental silver in the nanometric scale obtained in a biogenic or biomimetic manner, have interesting physicochemical properties and an elevated antimicrobial activity. Using aqueous extracts of fresh or dry orange (*Citrus sinensis*) peel, biosynthesis of these nanoparticles were successfully executed in 10-12 h. The synthesis using fresh orange peel resulted in a higher yield (83%), and the nanoparticles were stabilized with proteins that were identified by mass spectrometry (UPLC-MS/MS). These AgNPs have an average diameter of  $48,1 \pm 20,5$  nm and zeta potential around -20 mV. Also, through chemical and biomimetic synthesis, utilizing natural products extracted from orange waste, hesperidin (reducing agent) and nanocellulose (stabilizing agent), stable and uniform AgNPs were obtained. Their properties of average diameter and zeta potential were  $25,4 \pm 12,5$  nm and -30 mV, respectively. A nanocellulose film was impregnated with AgNPs obtained through the chemical route, resulting in a paper of nanocellulose and nanosilver. All the AgNPs (three types) presented bacteriostatic and bactericide effects against *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac strain 306), the phytopathogen responsible for the citrus canker disease in orange plantations, in concentrations of 20-30  $\mu\text{g/mL}$ . Finally, an agrochemical formulation containing AgNPs was proposed, thus enabling future tests in orange plantations affected by the citrus canker.

## Lista de figuras

- Figura 1.** (a) Influência da energia livre de Gibbs para a nucleação de nanopartículas. A linha vermelha (energia de superfície) representa uma contribuição desfavorável, ao passo que a linha azul (energia livre do bulk) mostra a contribuição favorável. O resultado é uma barreira de energia que deve ser transposta (correspondente ao raio crítico  $r_c$ ) para que as nanopartículas sejam formadas. (b) Teoria de La Mer exposta graficamente, na qual a supersaturação de monômeros ( $C_{max}$ ) leva à burst nucleation e crescimento por nucleação heterogênea. Figura adaptada de Polte (2015). ..... 19
- Figura 2.** Curva da energia potencial em função da distância entre dois núcleos segundo a teoria DLVO. Forças repulsivas (linha vermelha) se contrapõem a forças atrativas (linha azul) resultando em uma interação total que contém uma barreira de agregamento. Figura adaptada de Polte (2015). ..... 20
- Figura 3.** Processo de formação de nanopartículas de prata governado pela instabilidade coloidal (coalescência), que compreende etapas de redução, formação de clusters, coalescência, formação de estado metaestável e uma segunda fase de coalescência. Adaptado de Polte et al. (2012). ..... 21
- Figura 4.** (a) Representação gráfica dos níveis de energia quantizados de um nanocristal metálico. A seta verde representa a passagem de um elétron da banda de valência para a banda de condução, adaptado de Koole et al. (2014), e (b) representação gráfica que mostra o efeito de um campo elétrico na nuvem eletrônica de nanopartículas metálicas, o que induz o efeito de ressonância de plasmon de superfície. Adaptado de Kelly et al. (2003). ..... 22
- Figura 5.** (a) Esquema de um equipamento de espalhamento dinâmico de luz compreendendo um laser, amostra, fotomultiplicadora e autocorrelador. Adaptado de: <https://www.dkfz.de/Macromol/research/dls.html>. (b) As nanopartículas maiores possuem menor velocidade de migração em suspensão, tendo um maior tempo de correlação do que nanopartículas menores. Adaptado de: [https://en.wikipedia.org/wiki/Dynamic\\_light\\_scattering](https://en.wikipedia.org/wiki/Dynamic_light_scattering). ..... 26
- Figura 6.** Figura esquemática do potencial zeta de uma nanopartícula em suspensão. Adaptado de: [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/7/7b/Zeta\\_Potential\\_for\\_a\\_particle\\_in\\_dispersion\\_medium.png](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/7/7b/Zeta_Potential_for_a_particle_in_dispersion_medium.png) ..... 28
- Figura 7.** Esquema representativo de um Microscópio Eletrônico de Varredura. Adaptado de: <https://www.purdue.edu/ehps/rem/rs/sem.htm>. ..... 30
- Figura 8.** Esquema representativo de um Microscópio Eletrônico de Transmissão. Adaptado de: <https://global.britannica.com/technology/transmission-electron-microscope>. ..... 31
- Figura 9.** Reflexões em planos paralelos obedecendo a condição da lei de Bragg. Extraído de: [http://www-structmed.cimr.cam.ac.uk/Course/Basic\\_diffraction/Diffraction.html](http://www-structmed.cimr.cam.ac.uk/Course/Basic_diffraction/Diffraction.html) (acesso em 15/17/2017). ..... 32
- Figura 10.** Esquema representativo de um equipamento de ICP-OES. Amostra deve ser nebulizada para ser introduzida no plasma sob atmosfera de argônio. Adaptado de <http://www.chemiasoft.com/chemd/node/52>. ..... 33
- Figura 11.** Transições eletrônicas envolvendo o estado fundamental e estados virtuais. Transições Stokes e anti-Stokes dão origem ao espalhamento Raman. Adaptado de: <https://www.doitpoms.ac.uk/tlplib/raman/printall.php>. ..... 35

<b>Figura 12.</b> Diagrama de Jablonski, mostrando todas as transições eletrônicas e vibracionais possíveis em um sistema que pode emitir fluorescência e/ou fosforescência. Adaptado de: <a href="https://www.quora.com/What-is-the-Jablonski-diagram">https://www.quora.com/What-is-the-Jablonski-diagram</a> . ....	36
<b>Figura 13.</b> (a) Na técnica de dicróismo circular, a luz é circularmente polarizada por um laser de hélio, passando por uma cela contendo uma solução do analito. Extraído de: <a href="https://en.wikipedia.org/wiki/Circular_dichroism">https://en.wikipedia.org/wiki/Circular_dichroism</a> (acesso em 16/07/17). (b) Espectros de dicróismo circular característicos de cada um dos tipos de estrutura secundária de proteínas. Extraído de: <a href="http://www.fbs.leeds.ac.uk/facilities/cd/">http://www.fbs.leeds.ac.uk/facilities/cd/</a> (acesso em 16/07/17)..	38
<b>Figura 14.</b> Esquema de possíveis fragmentações de uma cadeia peptídica em um experimento de MS/MS. Adaptado de Roepstorff e Fohlman (1984). ....	39
<b>Figura 15.</b> Esquema simplificado de um equipamento de TGA. Adaptado de: <a href="http://lalithvarun.blogspot.com.br/2013/02/what-is-thermogravimetric-analysis.html">http://lalithvarun.blogspot.com.br/2013/02/what-is-thermogravimetric-analysis.html</a> .....	41
<b>Figura 16.</b> Cascas de laranja para preparo dos extratos aquosos, sendo (a) casca fresca e (b) casca seca (após 4 h em estufa). ....	44
<b>Figura 17.</b> Esquema de placa de 96 poços utilizada nos ensaios de CIM. ....	54
<b>Figura 18.</b> AgNP produzidas a partir de casca fresca de laranja; (a) diferença de coloração entre extrato (esquerda) e AgNP; (b) espectro no UV-Vis, com banda de ressonância de plasmon de superfície em 449 nm (após 48 h); (c) cinética da reação, com monitoramento de espectros acumulados ao longo de 48 h partindo do início da reação, com obtenção de espectro de meia em meia hora em 430 nm e em 280 nm e (d) difratograma de raios X, com janela de $2\theta = 30^\circ$ até $2\theta = 80^\circ$ . ....	60
<b>Figura 19.</b> AgNP produzidas a partir de casca seca de laranja; (a) diferença de cor entre extrato (esquerda) e suspensão de AgNP; (b) espectro no UV-Vis mostrando banda de plasmon de ressonância em 448 nm. ....	61
<b>Figura 20.</b> Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura da (a) AgNP de extrato de casca fresca e (b) AgNP de extrato de casca seca.....	61
<b>Figura 21.</b> Resultados de análises por microscopia eletrônica de transmissão, sendo (a) uma imagem adquirida de AgNP de extrato de casca fresca; (b) o histograma de faixas de tamanhos correspondente (contagem de nanopartículas = 227); (c) imagem adquirida de AgNP de extrato de casca seca e (d) histograma de faixas de tamanho correspondente (contagem de nanopartículas = 205). ....	63
<b>Figura 22.</b> (a) Estrutura da hesperidina com carbonos numerados; (b) estrutura da nanocelulose e (c) difratograma de raios X da nanocelulose.....	64
<b>Figura 23.</b> (a) Aspecto da suspensão de AgNP produzida por solução alcalina de hesperidina e estabilizada com nanocelulose extraída de bagaço industrial de laranja; (b) espectro no UV-Vis correspondente, com a presença de banda de ressonância de plasmon em 411 nm e (c) difratograma de raios X típico de prata metálica (AgNP). ....	65
<b>Figura 24.</b> Análises de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) para AgNP 3, mostrando (a) e (b) sistema uniforme de nanopartículas; (c) imagem obtida por perda de energia de 25 eV, apresentando capa de material orgânico (nanocelulose) em branco ao redor das nanopartículas e (d) histograma de faixas de tamanhos das nanopartículas (contagem de nanopartículas = 237). ....	66
<b>Figura 25.</b> Espectros de absorção na região do infravermelho para AgNP 3, nanocelulose e hesperidina.....	67
<b>Figura 26.</b> Análise das proteínas contidas no extrato de casca de laranja por eletroforese em gel SDS-PAGE (15%) mostrando a diferença entre padrões de mobilidade	

eletroforética das proteínas livres no extrato e complexadas com a prata na suspensão de AgNP (Padrão utilizado: Amersham Full-range Rainbow Molecular Weight Marker).	68
<b>Figura 27.</b> Espectros de emissão de fluorescência do extrato da casca de laranja fresca (diluído 2 vezes em água) e da suspensão de AgNP correspondente após excitação em 280 nm.	70
<b>Figura 28.</b> Espectros no infravermelho (FTIR) de amostras de extrato de casca fresca de laranja e AgNP correspondente.	71
<b>Figura 29.</b> Espalhamento Raman como fonte de informações de importantes modos de vibração presentes, sendo que (a) é o espectro utilizando laser vermelho 632,8 nm para amostras liofilizadas de extrato de casca fresca e AgNP 1 e (b) é o espectro obtido para amostra liofilizada de AgNP 1 utilizando laser de 785 nm.	72
<b>Figura 30.</b> Espectros de dicroísmo circular de extrato de casca de laranja fresca e AgNP 1 correspondente.	74
<b>Figura 31.</b> Representação de modelos tridimensionais em cartoon de proteínas hipotéticas identificadas por análise Shotgun no extrato de casca fresca de laranja utilizando o programa SWISS-MODEL.	78
<b>Figura 32.</b> Classificação de proteínas identificadas por experimento de UPLC-MS/MS. A separação foi feita com base em proteínas encontradas no exclusivamente no extrato (laranja), proteínas encontradas exclusivamente na superfície de AgNP (cinza claro) e encontradas em ambos os grupos (cinza escuro).	79
<b>Figura 33.</b> (a) Aparência de filme de nanocelulose extraída de bagaço industrial de laranja; (b) microscopia de varredura do filme mostra rugosidades e presença de nanofibras de nanocelulose e (c), (d) e (e) mostram propriedades ópticas do filme em contato com um objeto, a 0 cm, 2 cm e 5 cm de distância do objeto, respectivamente.	81
<b>Figura 34.</b> (a) Análise termogravimétrica de filmes de nanocelulose extraídos de bagaço de laranja utilizando atmosfera de nitrogênio e (b) derivada da análise termogravimétrica, destacando os eventos térmicos que ocorrem com o aumento gradual de temperatura.	82
<b>Figura 35.</b> Comparação entre espectros na região do infravermelho de filmes de nanocelulose produzidos.	83
<b>Figura 36.</b> Comparação de difratogramas de raios-X dos filmes de nanocelulose produzidos.	84
<b>Figura 37.</b> Microscopias eletrônicas de transmissão de nanopartículas de cloreto de prata produzidas por extrato bacteriano de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> (a), (b) e (c) e histograma de faixas de tamanho das nanopartículas (d) (contagem de nanopartículas = 241).	86
<b>Figura 38.</b> Difratograma de raios-X de amostra liofilizada de nanopartículas de cloreto de prata.	87
<b>Figura 39.</b> Espectros na região do infravermelho de extrato bacteriano de Xac e AgCl NP correspondente.	88
<b>Figura 40.</b> Espectros de emissão de fluorescência do extrato bacteriano de Xac (diluído 2 vezes em água) e da suspensão de nanopartículas de cloreto de prata correspondente após excitação das amostras em 280 nm (concentração proteica de $2,2 \pm 0,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).	89
<b>Figura 41.</b> Exemplo de microplaca de 96 poços após ensaio de CIM com Xac e AgNP 1. A linha 1 é um controle positivo, a linha 2 é um controle negativo, a linha 3 é a solução	

estoque de AgNP 1, e das linhas 4 a 12 foi feito um gradiente decrescente de concentração de AgNP. ....	90
<b>Figura 42.</b> (a) Folhas de Citrus utilizadas para verificação visual de alterações nas propriedades físico-químicas da suspensão de AgNP 1. (b) Efeito da adição de glicerol 0,2% (gota à direita) na viscosidade da suspensão. (c) Efeito da adição de oleato de sorbitano 0,05% (gota à esquerda) no espalhamento da suspensão. ....	94
<b>Figura A1.</b> Espectro de $^1\text{H}$ RMN (abaixo) e $^{13}\text{C}$ RMN (acima) da hesperidina, feito em DMSO- $\text{d}^6$ em equipamento Bruker Avance 600 MHz. ....	116
<b>Figura A2.</b> Medidas de diâmetro hidrodinâmico (acima) e potencial zeta para AgNP 1. ....	118
<b>Figura A3.</b> Medidas de diâmetro hidrodinâmico (acima) e potencial zeta para AgNP 2. ....	119
<b>Figura A4.</b> Medidas de diâmetro hidrodinâmico (acima) e potencial zeta para AgNP 3. ....	120
<b>Figura A5.</b> Medidas de diâmetro hidrodinâmico (acima) e potencial zeta para AgCl NP. ...	121
<b>Figura A6.</b> Relatório de análise NTA da AgNP 1. ....	122
<b>Figura A7.</b> Relatório de análise NTA da AgNP 2. ....	123
<b>Figura A8.</b> Relatório de análise NTA da AgNP 3. ....	124
<b>Figura A9.</b> Curva de calibração de prata utilizando equipamento de ICP-OES. ....	125



## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>1.1 Cancro cítrico na citricultura brasileira .....</b>	<b>15</b>
1.1.1 <i>Produção de laranjas no Brasil.....</i>	15
1.1.2 <i>O cancro cítrico.....</i>	15
<b>1.2 Nanopartículas de prata .....</b>	<b>17</b>
1.2.1 <i>Síntese de nanopartículas de prata .....</i>	17
1.2.2 <i>Mecanismos de formação de nanopartículas de prata.....</i>	18
1.2.3 <i>Propriedades físico-químicas de nanopartículas de prata.....</i>	21
1.2.4 <i>Aplicações de nanopartículas de prata .....</i>	23
<b>1.3 Técnicas de caracterização de nanopartículas de prata .....</b>	<b>24</b>
1.3.1 <i>Espectroscopia no ultravioleta-visível (UV-Vis).....</i>	24
1.3.2 <i>Espalhamento Dinâmico de Luz .....</i>	24
1.3.3 <i>Nanoparticle Tracking Analysis (NTA).....</i>	26
1.3.4 <i>Potencial zeta .....</i>	27
1.3.5 <i>Microscopia Eletrônica de Varredura .....</i>	29
1.3.6 <i>Microscopia Eletrônica de Transmissão.....</i>	30
1.3.7 <i>Difração de raios X .....</i>	32
1.3.8 <i>Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente .....</i>	33
<b>1.4 Técnicas de caracterização de interações entre biomoléculas e nanopartículas de prata.....</b>	<b>34</b>
1.4.1 <i>Espectrofotometria de absorção no infravermelho .....</i>	34
1.4.2 <i>Espalhamento Raman.....</i>	34
1.4.3 <i>Emissão de fluorescência .....</i>	36
1.4.4 <i>Dicroísmo circular.....</i>	37
1.4.6 <i>Análise termogravimétrica.....</i>	40
<b>1.5 Atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata .....</b>	<b>41</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>43</b>
2.1 <b>Objetivos gerais.....</b>	<b>43</b>
2.2 <b>Objetivos específicos .....</b>	<b>43</b>
<b>3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>44</b>
<b>3.1 Preparo de extratos e extração de biomoléculas da laranja.....</b>	<b>44</b>
3.1.1 <i>Extratos aquosos de casca de laranja.....</i>	44
3.1.2 <i>Extração de hesperidina da casca da laranja.....</i>	45
3.1.3 <i>Extração de nanocelulose de bagaço de laranja industrial.....</i>	45
<b>3.2 Síntese de AgNP.....</b>	<b>46</b>
<b>3.3 Caracterização de AgNP .....</b>	<b>46</b>
3.3.1 <i>Espectroscopia na região do UV-Vis.....</i>	46
3.3.2 <i>Análises de espalhamento de luz e potencial zeta .....</i>	47
3.3.3 <i>Nanoparticle Tracking Analysis (NTA).....</i>	47
3.3.4 <i>Difração de raios X .....</i>	47
3.3.5 <i>Microscopia Eletrônica de Varredura .....</i>	47
3.3.6 <i>Microscopia Eletrônica de Transmissão.....</i>	48

3.3.7 Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES) .....	48
<b>3.4 Estudo das interações em AgNP .....</b>	<b>49</b>
3.4.1 Método de Bradford de quantificação de proteínas .....	49
3.4.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE 15%).....	49
3.4.3 Espectroscopia de emissão de fluorescência .....	50
3.4.4 Espectroscopia no infravermelho.....	50
3.4.5 Espalhamento Raman.....	50
3.4.6 Dicroísmo circular.....	50
<b>3.5 Ensaios de Concentração Inibitória Mínima (CIM) .....</b>	<b>53</b>
<b>3.6 Formulação de agroquímico contendo AgNP .....</b>	<b>54</b>
<b>3.7 Produção e caracterização de filmes de nanocelulose contendo nanopartículas de prata.....</b>	<b>55</b>
3.7.1 Produção de filmes de nanocelulose .....	55
3.7.2 Caracterização dos filmes de nanocelulose .....	56
<b>3.8 Síntese e caracterização de nanopartículas de cloreto de prata (AgCl NP) a partir de extrato de proteínas extracelulares de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>.....</b>	<b>56</b>
3.8.1 Síntese de nanopartículas de cloreto de prata .....	57
3.8.2 Caracterização de nanopartículas de cloreto de prata .....	57
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>58</b>
4.1 Caracterização das AgNP produzidas.....	58
4.2 Caracterização de interações entre biomoléculas e AgNP.....	67
4.3 Produção e caracterização de filmes de nanocelulose contendo nanopartículas de prata.....	79
4.4 Síntese biogênica de nanopartículas de cloreto de prata (AgCl NP) utilizando extrato bacteriano .....	84
4.5 Ensaios de Concentração Inibitória Mínima (CIM) .....	89
4.6 Formulação de agroquímico contendo AgNP .....	92
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>96</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>98</b>
<b>APÊNDICE 1 .....</b>	<b>116</b>
<b>APÊNDICE 2 .....</b>	<b>118</b>
<b>APÊNDICE 3 .....</b>	<b>122</b>
<b>APÊNDICE 4 .....</b>	<b>125</b>
<b>APÊNDICE 5 .....</b>	<b>126</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Cancro cítrico na citricultura brasileira

#### 1.1.1 *Produção de laranjas no Brasil*

A laranja da espécie *Citrus sinensis*, típica de climas tropicais e subtropicais, representa uma das maiores produções frutíferas do Brasil. Apenas entre janeiro de 2016 e janeiro de 2017, o Brasil foi responsável pela colheita de 18 milhões de toneladas do fruto, o que representa quase o triplo em produtividade em relação à China e União Europeia (segundo e terceiro colocados, respectivamente). Esta produtividade representa 37% da produção global de laranjas, colocando o Brasil no primeiro lugar também em exportações do fruto (Citrus: World Markets and Trade, 2017). A forte produção de laranjas no Brasil possui como finalidade principal a produção de suco da fruta, que é comercializado por indústrias localizadas majoritariamente no estado de São Paulo.

A extração do suco tem como consequência a produção de resíduos que são processados industrialmente até resultarem em um produto que atualmente é destinado à alimentação de gado. O suco representa cerca de 50% do fruto; os outros 50% compreendem casca, albedo, sementes e bagaço (Saenz e Estevez, 2007). O resíduo é rico em fibras solúveis em água (18,6%), fibras insolúveis em água (22,9%), com a presença de lipídeos (0,6%), amido (7,1%) e proteínas (4%) (Romero-Lopez et al. 2011).

O grupo do Laboratório de Química Biológica (LQB) tem sido um dos pioneiros na reutilização deste resíduo para variadas aplicações, que vão desde extração de produtos naturais (Mariño et al. 2015) até a produção de etanol de segunda geração (Cypriano et al. 2017). Este projeto também se insere em um contexto de sustentabilidade na medida em que propõe reutilizar resíduos da laranja para a produção de nanopartículas de prata, o que será explorado em seções subsequentes.

#### 1.1.2 *O cancro cítrico*

A produção de laranjas no Brasil tem enfrentado nas últimas décadas a ameaça de algumas doenças que comprometem a produtividade das plantações. Dentre elas, pode-se destacar a Huanlongbing (HLB), causada pelo fitopatógeno *Candidatus Liberibacter* spp. (Pontes et al. 2016) e a Clorose Variegada dos Citros (CVC), causada pela bactéria *Xyllela fastidiosa* (Mendes et al. 2016). No entanto, uma das maiores doenças, atualmente, é o cancro cítrico, causado pelo fitopatógeno *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*). O cancro cítrico foi observado pela primeira vez em 1912, nos Estados Unidos, e passou por sucessivas etapas de erradicação e reaparecimento (Graham et al. 2004). A bactéria causadora da doença é facilmente disseminada pelo vento e pelo contato humano (Burning e Gabriel, 2003), entrando em seu hospedeiro por feridas ou estômatos (Vojnov et al. 2010), chegando ao mesofilo, onde então produz biofilme. A sobrevivência e aderência da bactéria nestes tecidos só ocorre com a formação de uma substância extracelular polimérica, constituída basicamente por goma xantana. A partir deste estágio de biofilme, a *Xac* mostra então sua patogenicidade (Zimaro et al. 2013; Rigano et al. 2007), induzindo sintomas como o aparecimento de pústulas amareladas em folhas e frutos (Das, 2003), levando ao desfolhamento, queda prematura de laranjas (Qin et al. 2009) e, consequentemente, à perda de produtividade.

A cepa 306 é a mais estudada atualmente, contendo um DNA cromossômico e dois plasmidiais (pXAC33 e pXAC64) (Silva et al. 2002). Por mais que estudos sobre seu código genético (Khater et al. 2005) e proteínas (Alegria et al. 2005; Tasic et al. 2007) possivelmente ligadas à sua patogenicidade tenham sido feitos, uma forma eficaz de combate à esta doença ainda se apresenta distante de ser concretizada. Atualmente, a única forma de controle do cancro cítrico se dá por meio da queima de plantas infectadas e de plantas saudáveis em um raio de 30 m, o que inutiliza o terreno para futuros plantios a médio prazo. Esta medida de controle está completamente sujeita a mudanças na legislação, que são variáveis de acordo com o Estado onde se faz o plantio (Sanches et al. 2014). Estimativas apontam que, na hipótese de que nenhuma medida de combate ao cancro seja tomada, até 2030 mais de 80% dos talhões no Brasil estarão contaminados pela doença (Sanches et al. 2014), tendo em vista a sua rápida disseminação. Desta forma, novas alternativas de controle do cancro cítrico se fazem urgentes no atual cenário da agricultura brasileira.

## 1.2 Nanopartículas de prata

### 1.2.1 Síntese de nanopartículas de prata

As nanopartículas de prata podem ser produzidas por variados métodos físicos, químicos e biológicos (Iravani et al. 2014). As sínteses físicas, ainda que menos comuns, envolvem geralmente um método *top-down*, no qual nanopartículas são produzidas a partir do mesmo material partindo de uma dimensão maior. O método de ablação a laser, por exemplo, pode gerar nanopartículas monodispersas e estáveis (Valverde-Alva et al. 2015). Por outro lado, métodos químicos são mais comumente utilizados e reportados, sendo os mais adequados quando se deseja nanopartículas com um controle mais rigoroso de tamanho e forma (Bastus et al. 2014; Henglein e Giersig, 1999). Neste tipo de síntese, uma fonte de íons prata (geralmente, nitrato de prata), é utilizada para gerar *clusters* de prata metálica após redução induzida por um agente redutor específico em solução. Agentes estabilizadores também são muito utilizados neste contexto para prover uma prolongação da estabilidade coloidal e para aumentar o controle sobre a forma geométrica das nanopartículas (Meng, Tang e Vongehr, 2010).

No entanto, devido à emergente necessidade de uma abordagem “verde” e sustentável na ciência, um maior foco tem sido empregado às sínteses biológicas ou biogênicas, que têm como fonte de agentes redutores e estabilizadores extratos de fungos (Gade et al. 2014; Rodrigues et al. 2013), bactérias (Gou et al. 2015) (Priyadarshini et al. 2013) ou plantas (Ahmed et al. 2016). Particularmente, muitas sínteses biogênicas utilizando extratos de plantas têm sido reportadas devido à sua alta biocompatibilidade com sistemas biológicos (Rajan et al. 2015), incluindo rotas que utilizam extratos de babosa (Medda et al. 2015), uva (Roy et al. 2015), limão (Praphulla et al. 2014), carvalho (Korbekandi et al. 2015) e folhas de pimenta (Mallikarjuna et al. 2014), por exemplo. Em sínteses biogênicas, as nanopartículas são impedidas de agregarem ou coalescerem geralmente em função de uma estabilização estérea provida por biomoléculas como polissacarídeos (Ban e Paul, 2016) ou proteínas (Gnanadhas et al. 2013). De fato, proteínas são tidas como os agentes estabilizadores mais proeminentes, interagindo na superfície metálica com seus átomos de nitrogênio e/ou enxofre (Ballotin et al. 2016; Durán et al. 2015).

### 1.2.2 Mecanismos de formação de nanopartículas de prata

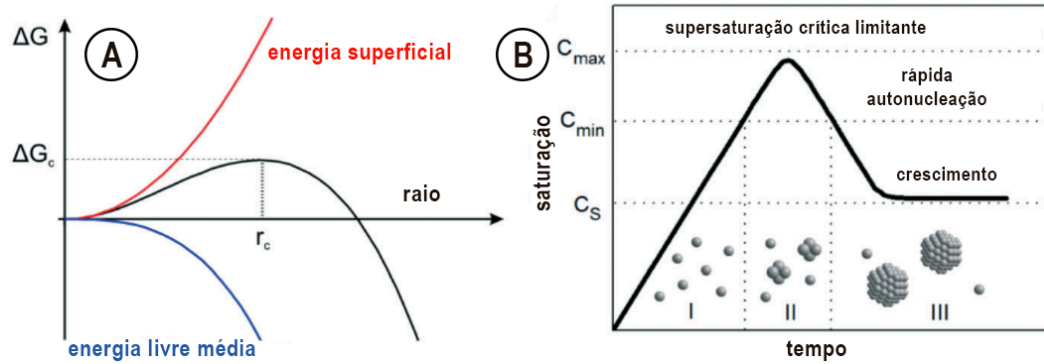
Algumas teorias de formação de nanopartículas metálicas vêm sendo formuladas há várias décadas com a intenção de se obter uma maior elucidação dos mecanismos que regem a formação de um estado tido como metaestável. Duas abordagens são geralmente mais citadas, sendo elas a teoria que envolve a estabilidade termodinâmica de nanopartículas e a segunda, que envolve a estabilidade do sistema coloidal.

A visão termodinâmica encontra suas raízes na teoria CNT (*Classical Nucleation Theory*), proposta há mais de 70 anos (Becker e Doring, 1935). Tal teoria explica a nucleação de nanopartículas como um processo regido por forças entrópicas, na qual o processo de formação de pequenos núcleos metálicos em suspensão é favorecido por um ganho de entropia do *bulk* da solução, que é balanceado pelo processo desfavorável de aumento de energia de superfície do sistema como um todo (Equação 1).

$$\Delta G = -\frac{4}{3}\pi r^3 |\Delta G_V| + 4\pi^2 \gamma \quad (\text{Equação 1})$$

Onde  $r$  é o raio da partícula,  $\Delta G_V$  é a diferença de energia de Gibbs por unidade de volume e  $\gamma$  é a energia de superfície por unidade de área.

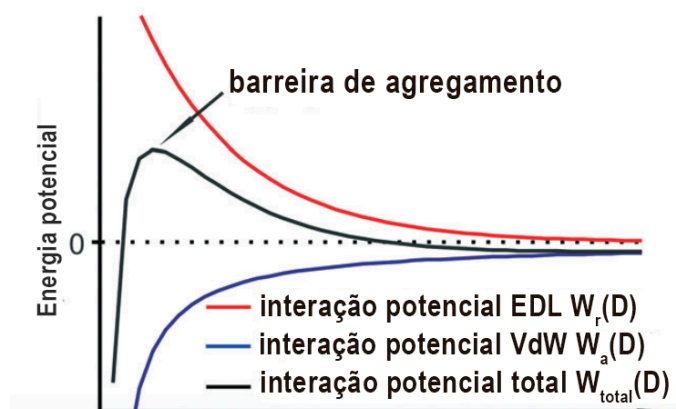
A teoria CNT foi mais tarde aperfeiçoada por La Mer em 1952 (La Mer, 1952), que além de explicar o mecanismo de nucleação de nanopartículas, também propôs uma explicação para o crescimento dos *clusters* em suspensão. A formação de nanopartículas seria induzida por uma supersaturação de monômeros ( $\text{Ag}^0$ ) em solução, induzindo o fenômeno de “*burst nucleation*”, no qual os primeiros *clusters* de prata (ou qualquer outro metal) são formados, diminuindo a concentração de monômeros. Em seguida, em uma fase de crescimento, monômeros vão gradualmente se ligando aos *clusters* por nucleação heterogênea (isto é, nucleação na presença de uma interface distinta que não o *bulk* da solução). A Figura 1 mostra gráficos explicativos extraídos da literatura de ambas as teorias mencionadas.



**Figura 1.** (a) Influência da energia livre de Gibbs para a nucleação de nanopartículas. A linha vermelha (energia de superfície) representa uma contribuição desfavorável, ao passo que a linha azul (energia livre do bulk) mostra a contribuição favorável. O resultado é uma barreira de energia que deve ser transposta (correspondente ao raio crítico  $r_c$ ) para que as nanopartículas sejam formadas. (b) Teoria de La Mer exposta graficamente, na qual a supersaturação de monômeros ( $C_{max}$ ) leva à *burst nucleation* e crescimento por nucleação heterogênea. Figura adaptada de Polte (2015).

Uma segunda abordagem, mais voltada para a estabilidade do sistema coloidal em função de forças eletrostáticas, foi proposta por Derjaguin, Landau, Verwey e Overbeek (cientistas que originaram o nome da teoria – DLVO (Verwey e Overbeek, 1948)). Tal teoria explica a estabilidade de um sistema coloidal e propõe formas de estudo do crescimento de nanopartículas, ainda que não proponha diretamente mecanismos de nucleação. Um coloide seria regido por forças atrativas de van der Waals ( $W_a$ ) e forças repulsivas eletrostáticas ( $W_r$ ), considerando que a superfície de nanopartículas é intrinsecamente carregada (Equação 2).

$$W_{total} = W_a + W_r \quad (\text{Equação 2})$$

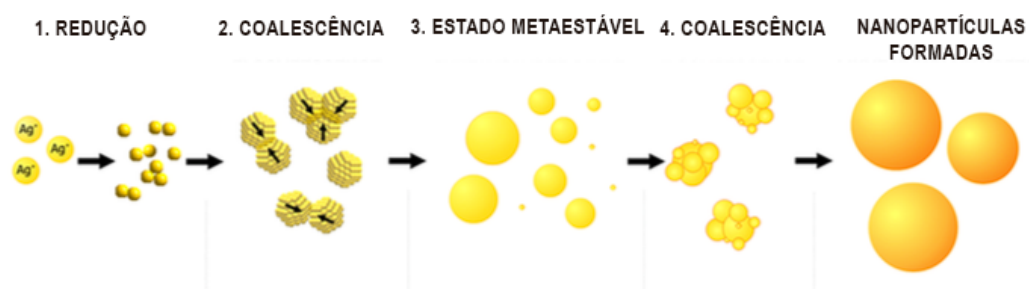


**Figura 2.** Curva da energia potencial em função da distância entre dois núcleos segundo a teoria DLVO. Forças repulsivas (linha vermelha) se contrapõem a forças atrativas (linha azul) resultando em uma interação total que contém uma barreira de agregamento. Figura adaptada de Polte (2015).

O gráfico resultante da soma destas interações (Figura 2) contém uma energia de ativação que é chamada de barreira de agregamento. À distâncias menores da correspondente ao máximo desta barreira, ocorre o fenômeno de coalescência, o qual é um mecanismo irreversível de crescimento de nanopartículas baseado na união de duas ou mais partículas menores em suspensão, formando apenas uma partícula maior. Esta energia de ativação é diretamente dependente do raio das nanopartículas, tipos e cargas dos íons presentes em solução e existência ou ausência de agentes que promovem impedimento estérico.

Teorias mais recentes e embasadas em experimentações práticas indicam que o único processo responsável pelo crescimento de nanopartículas de prata é o de coalescência, o que de certa forma contradiz a teoria clássica de La Mer. De fato, duas etapas de coalescência são necessárias para que as nanopartículas cheguem à sua distribuição de tamanhos final, como mostrado na Figura 3.

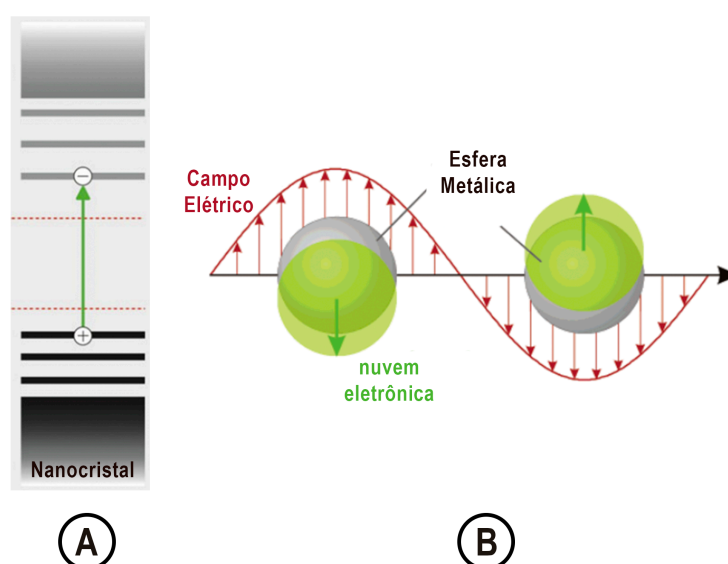




**Figura 3.** Processo de formação de nanopartículas de prata governado pela instabilidade coloidal (coalescência), que compreende etapas de redução, formação de clusters, coalescência, formação de estado metaestável e uma segunda fase de coalescência. Adaptado de Polte et al. (2012).

### 1.2.3 Propriedades físico-químicas de nanopartículas de prata

Nanopartículas de prata são aglomerados de átomos de prata no seu estado elementar que possuem, em pelo menos uma de suas dimensões, até 100 nm. A diminuição de tamanho de uma escala macroscópica para a nanométrica induz uma série de mudanças físicas e químicas no material. Primeiramente, é preciso considerar que, na forma de nanopartículas, a prata possui uma área superficial consideravelmente maior do que sua versão *bulk*. Como a proporção de átomos pertencentes ao *bulk* em relação à átomos da superfície diminui consideravelmente, todo o conhecimento químico tradicional da prata se torna inaplicável em um sistema regido majoritariamente por interações na superfície. Com a diminuição de tamanho do nanomaterial metálico, o efeito de confinamento quântico é observado. Este efeito é decorrente da dependência da energia do *gap* entre bandas de condução e de valência de um material de acordo com seu tamanho. Tais níveis de energia se tornam discretos ou quantizados quando o diâmetro deste material se torna comparável ao comprimento de onda de de Broglie de seus elétrons (Mitin, Sementsov e Vagidov, 2010) (Figura 4a).



**Figura 4.** (a) Representação gráfica dos níveis de energia quantizados de um nanocrystal metálico. A seta verde representa a passagem de um elétron da banda de valência para a banda de condução, adaptado de Koole et al. (2014), e (b) representação gráfica que mostra o efeito de um campo elétrico na nuvem eletrônica de nanopartículas metálicas, o que induz o efeito de ressonância de plasmon de superfície. Adaptado de Kelly et al. (2003).

Das propriedades quânticas intrínsecas de nanopartículas metálicas surge a principal propriedade física deste tipo de sistemas: a ressonância de plasmon de superfície (*surface plasmon resonance* – SPR). A incidência de fótons em uma suspensão de nanopartículas induz um deslocamento da nuvem eletrônica em relação ao núcleo. Uma força Coulombica restauradora produz então uma oscilação coletiva de elétrons da banda de condução, emitindo fótons de comprimento de onda específico, como mostrado na Figura 4b. A frequência da oscilação é determinada pelo tamanho e forma das nanopartículas, bem como a densidade e a massa dos elétrons (Kelly et al. 2003). Na prática, a SPR é detectada corriqueiramente como diagnóstico da formação de AgNP pela espectroscopia na região do UV-Vis, na forma de uma banda na região entre 395-425 nm (no caso de AgNP esféricas). Visualmente, a suspensão adquire uma coloração que pode ir desde amarela até alaranjada. No caso de nanopartículas com formas como cilindros ou cubos, a banda de SPR pode ser deslocada para maiores comprimentos de onda (Amendola, Bakr e Stellacci, 2010). Deslocamentos também são observados no caso de

associação de compostos orgânicos doadores ou aceptores de elétrons à superfície das AgNP (Mogensen e Kneipp, 2014).

#### 1.2.4 Aplicações de nanopartículas de prata

Sais de prata e até mesmo a prata coloidal vêm sendo utilizados há séculos em formulações para aplicações que vão desde filmes fotográficos até pomadas para queimaduras (Dai et al. 2010). Com a emergência de um estudo mais aprofundado da nanotecnologia nas últimas décadas, estas aplicações e variadas outras foram melhor elucidadas. Juntamente com a gama de novas propriedades que a prata adquire ao adentrar na escala nanométrica, surgem variadas aplicações para estes nanomateriais. O fenômeno de SPR, sendo intrinsecamente ligado às dimensões das nanopartículas, vem sendo usado como ferramenta para nanosensores de prata. Tais sensores conseguem chegar aos limites de detecção de analitos, podendo até mesmo ser utilizados para detecção de uma única molécula (Anker et al. 2008). Adicionalmente, o efeito de SERS (*surface enhanced raman scattering*), conhecido por aumentar as linhas Raman de moléculas adsorvidas ou quimiossorvidas em nanopartículas metálicas, já vem sendo utilizado em sensores de compostos orgânicos (Soliveri et al. 2016).

Em um contexto mais biológico, as nanopartículas de prata também podem ser utilizadas em sistemas de entrega de fármacos, aumentando a atividade anticâncer de compostos já utilizados em quimioterapias (Benyettou et al. 2015). Também, a cura de ferimentos e queimaduras, aplicação já antiga para a nanoprata, já foi melhor estudada e foi relacionada diretamente às atividades antimicrobiana e anti-inflamatória de AgNP (Gunasekaran, Nigusse e Dhanaraju, 2012). O uso tópico de nanoprata expandiu sua aplicação comercial para *shampoos*, sabonetes, pomadas e cremes (Bansod et al. 2015), uma vez que este nanomaterial não é capaz de ser absorvido para as camadas mais internas da pele, tendo uma toxicidade sistêmica negligenciável (Gajbhiye e Sakharwade, 2016).

No entanto, atualmente a aplicação que vem sendo mais intensamente explorada para nanopartículas de prata são as que envolvem sua capacidade bacteriostática e bactericida. Por agir com variados mecanismos que atuam concomitantemente (o que será explanado em seções posteriores deste trabalho), as AgNP possuem uma atividade pronunciada que funciona até mesmo contra

bactérias multirresistentes à antibióticos (Cavassin et al. 2015). Devido à esta propriedade antimicrobiana, AgNP vêm tendo sua aplicação estudada na agricultura (Larue et al. 2014), veterinária (Asgary et al. 2016), em têxteis (Dubas, Kumlangdudsana e Potiyaraj, 2006), em embalagens de alimentos (Carbone et al. 2016), tratamento de água (Sun et al. 2015) e no meio hospitalar (Ballottin et al. 2017).

### **1.3 Técnicas de caracterização de nanopartículas de prata**

#### *1.3.1 Espectroscopia no ultravioleta-visível (UV-Vis)*

Diferentemente de espécies orgânicas corriqueiramente analisadas quanto às suas transições eletrônicas com a técnica de espectroscopia no UV-Vis, as AgNP não possuem uma cor característica devido à tradicional absorção eletrônica. Na realidade, a ressonância de plasmon de superfície é o fenômeno responsável pela absorção de fótons na região do visível (entre 395 e 425 nm, para AgNP esféricas). Existem vários modos de ressonância possíveis, no entanto o mais importante é o de  $l = 1$ , correspondente ao “modo de Mie”, que possui um campo de dipolo opticamente ativo (Eccles et al. 2010).

A banda de SPR é intrinsicamente ligada à forma e tamanho das nanopartículas, sendo deslocada para maiores comprimentos de onda com aumento de tamanho (Mogensen e Kneipp, 2014), alongamento da estrutura (Filippo et al. 2010) ou mesmo associação de agentes estabilizantes em sua superfície (Ajitha et al. 2016). Os nanoprismas de prata, por exemplo, podem ter colorações que variam de amarelo até azul e ter sua banda de SPR localizadas até 700 nm (Frank et al. 2010), enquanto que nanocubos de prata podem também ter sua banda de SPR deslocadas para regiões entre 500-600 nm (Zhou et al. 2016). Experimentalmente, a técnica de espectroscopia no UV-Vis é uma ferramenta simples e poderosa que fornece informações sobre a formação de AgNP, e também abre a possibilidade de monitoramento de cinética de reação.

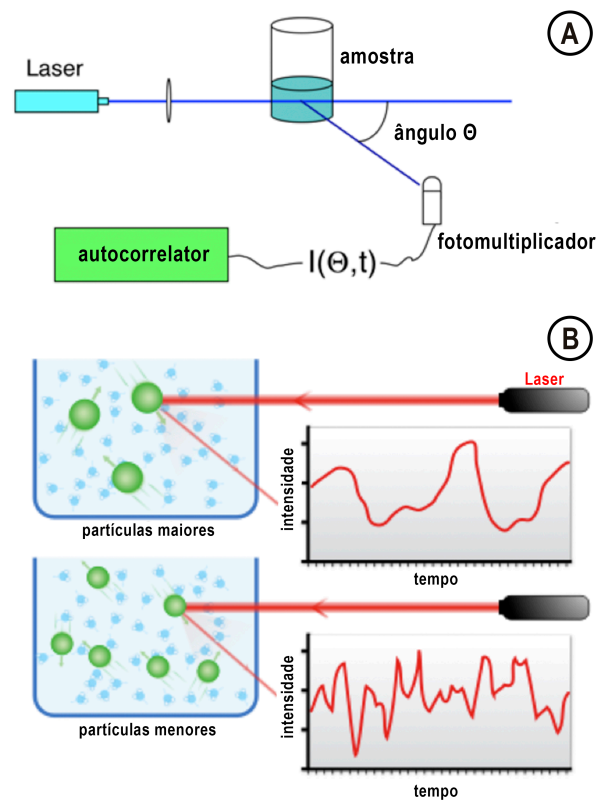
#### *1.3.2 Espalhamento Dinâmico de Luz*

O espalhamento dinâmico de luz (*dynamic light scattering* – DLS) é a técnica que utiliza um laser que é incidido sobre uma suspensão de nanopartículas, sendo espalhado para todas as direções. Um detector com fotomultiplicadora situado a um ângulo  $\theta$  do feixe de laser recolhe informações de luz espalhada em função do tempo (Figura 5). Como as nanopartículas se movem por movimento Browniano, existem flutuações na concentração local de nanopartículas, o que causa mudanças no índice de refração local e, conseqüentemente, na intensidade da luz espalhada. Esta intensidade é dependente do tamanho das nanopartículas, uma vez que as maiores se movem mais lentamente, ao passo que as menores se movem mais rapidamente. A partir da determinação da intensidade de luz espalhada em função do tempo, é determinada a velocidade das nanopartículas através de um correlograma, que é convertida então no coeficiente de difusão  $D_t$  das nanopartículas (Dahneke, 1983). A partir destas informações, o diâmetro hidrodinâmico  $d_H$  é calculado pela equação de Stokes Einstein, mostrada na Equação 3.

$$d_H = \frac{kT}{3\pi\eta D_t} \quad (\text{Equação 3})$$

Onde  $k$  é a constante de Boltzman,  $\eta$  é a viscosidade do solvente e  $T$  é a temperatura.

O diâmetro hidrodinâmico compreende não só o diâmetro do núcleo da nanopartículas, mas também da capa orgânica em sua volta e da camada de solvatação.



**Figura 5.** (a) Esquema de um equipamento de espalhamento dinâmico de luz compreendendo um laser, amostra, fotomultiplicadora e autocorrelador. Adaptado de: <https://www.dkfz.de/Macromol/research/dls.html>. (b) As nanopartículas maiores possuem menor velocidade de migração em suspensão, tendo um maior tempo de correlação do que nanopartículas menores. Adaptado de: [https://en.wikipedia.org/wiki/Dynamic\\_light\\_scattering](https://en.wikipedia.org/wiki/Dynamic_light_scattering).

Esta técnica se mostra de extrema importância na nanotecnologia, uma vez que permite acessar facilmente características como distribuição de tamanhos global da amostra e polidispersidade, sendo estes parâmetros importantes no acompanhamento da estabilidade do sistema coloidal. Dentre as limitações desta técnica, pode-se destacar a baixa resolução do equipamento quando comparada à uma medida de tamanhos utilizando técnicas de microscopia e a aproximação de qualquer nanoestrutura para nanoesferas pelo *software* do equipamento.

### 1.3.3 Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)

Esta técnica foi introduzida no mercado recentemente, no ano de 2006, e se apresenta como uma alternativa para medidas de distribuição de tamanhos de uma amostra. O NTA utiliza um laser que é espalhado pelas nanopartículas da amostra, permitindo a visualização das mesmas por uma câmera CCD (*charge-coupled device*) e a gravação de um vídeo das nanopartículas se movendo de acordo com seu movimento Browniano (Filipe, Hawe e Jiskoot, 2010). O *software* do equipamento então identifica e rastreia cada nanopartícula filmada pela câmera e relaciona sua velocidade com o tamanho da nanopartícula de acordo com a Equação 4.

$$\overline{(x,y)^2} = \frac{2kT}{3r_H\pi\eta} \quad \text{Equação 4}$$

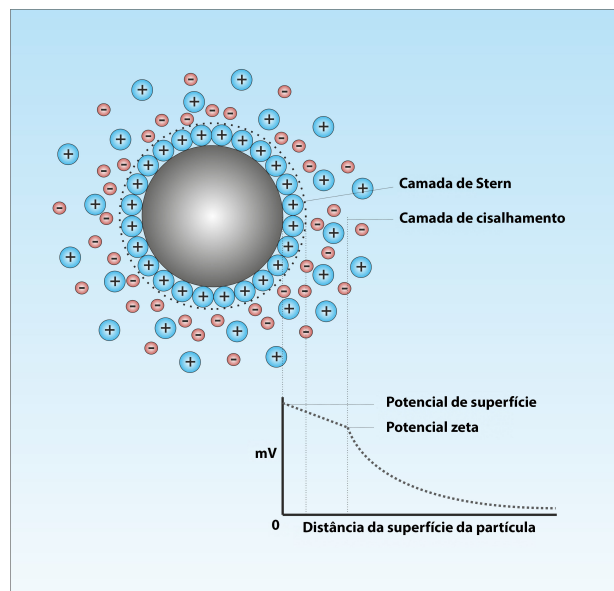
Onde  $k$  é a constante de Boltzman,  $\overline{(x,y)^2}$  é a velocidade média de uma nanopartícula na temperatura  $T$ , em um meio com viscosidade  $\eta$ , com raio hidrodinâmico  $r_H$ .

Em relação à técnica de DLS, o NTA apresenta uma série de vantagens, como uma maior resolução de distribuições de tamanho polidispersas, a possibilidade de visualizar as nanopartículas em suspensão por meio de uma câmera e a necessidade de menor volume de amostra para análise. Por outro lado, o NTA apresenta a possibilidade do operador realizar análises tendenciosas, uma vez que o mesmo pode escolher a região da amostra da qual deseja analisar a distribuição de tamanhos, e parâmetros como contraste e brilho do vídeo podem influenciar na medida de tamanho das nanopartículas (Filipe, Hawe e Jiskoot, 2010). De qualquer forma, o uso desta técnica tem crescido na nanotecnologia, sendo utilizada em diversas áreas (Mazzarino et al. 2012; Mellema et al. 2016), incluindo no estudo de nanopartículas de prata (Luque et al. 2013).

#### 1.3.4 Potencial zeta

A medida do potencial zeta ( $\zeta$ ) de uma suspensão coloidal é essencial para a avaliação da estabilidade eletrostática do sistema. Considerando que toda nanopartícula possui cargas em sua superfície, uma camada de íons de carga contrária a envolve de forma compacta, sendo esta a chamada camada de Stern. Os

íons próximos à camada de Stern ainda sentem a atração das cargas de superfície da nanopartícula, arrastando com eles moléculas de água de solvatação. O movimento de uma nanopartícula em suspensão arrasta, portanto, os íons da camada de Stern e desta camada difusa, juntamente com a esfera de solvatação. O potencial zeta corresponde ao potencial elétrico da camada de cisalhamento entre a atmosfera iônica da nanopartícula e o *bulk* (Hunter, 1981) (Figura 6).



**Figura 6.** Figura esquemática do potencial zeta de uma nanopartícula em suspensão. Adaptado de:

[https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/7/7b/Zeta\\_Potential\\_for\\_a\\_particle\\_in\\_dispersion\\_medium.png](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/7/7b/Zeta_Potential_for_a_particle_in_dispersion_medium.png)

O equipamento responsável pela medida do potencial zeta utiliza um campo elétrico, que é sentido pelas cargas que envolvem as nanopartículas através dos eletrodos contidos na cela onde se situa a amostra. Desta forma, a mobilidade das nanopartículas é medida ao serem atraídas pelo eletrodo de carga oposta (Equação 5). O equipamento utiliza a teoria de Debye-Huckel para a medida do potencial, que usa algumas aproximações, como a consideração de que a concentração de íons é baixa e a dissociação de sais é completa, além de que a suspensão é eletricamente neutra na sua totalidade e que as nanopartículas são idealmente esféricas.

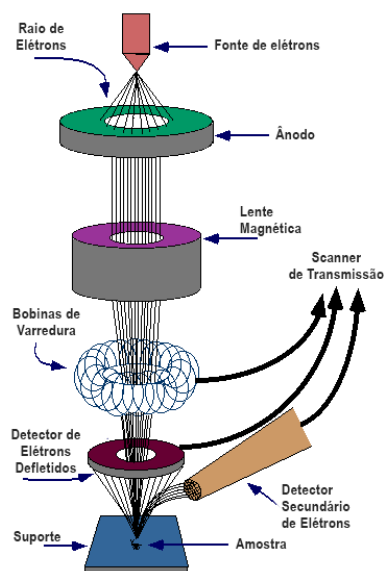
$$\mu = [2\varepsilon\zeta \cdot f(ka)]/3\eta \text{ (Equação 5)}$$



Na Equação 5,  $\mu$  é a mobilidade eletroforética,  $\varepsilon$  é a constante dielétrica do solvente,  $\zeta$  é o potencial zeta,  $\eta$  é a viscosidade do meio e  $f(ka)$  é a função de Henry, sendo que  $1/k$  é a espessura da dupla camada elétrica e  $a$  é o diâmetro equivalente de uma partícula esférica (Júnior e Baldo, 2014). Para que suspensões sejam tidas como muito estáveis eletrostaticamente, isto é, com baixa propensão à fenômenos de agregação ou coalescência, o potencial zeta  $\zeta$  deve ser maior que 30 mV em módulo. Suspensões de nanopartículas de prata geralmente possuem um pontencial zeta negativo, e sua estabilidade pode ser facilmente verificada pela medida deste parâmetro (Sondi, Goia e Matijevic, 2003).

### 1.3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura

A microscopia eletrônica de varredura (*scanning electron microscopy* – SEM) apresenta um avanço significativo em relação à microscopia óptica tradicional, uma vez que possui magnificação de até 30.000 vezes e resolução de 50-100 nm. Para se obter imagens de maior resolução, elétrons são usados por possuírem um menor comprimento de onda. A amostra é bombardeada por elétrons acelerados por uma energia de 2 a 1000 keV por uma *Field-Emission Gun* (FEG), *Thermal Electron Gun* ou *Schottky*, que são focalizados por lentes magnéticas (Figura 7), gerando então elétrons espalhados (que podem fornecer informações sobre a topografia), raios-X (para análise elementar) e, mais importante, elétrons secundários (Zhou e Wang, 2007). Os elétrons secundários emitidos pela amostra, geralmente com energias entre 0 e 50 eV, são detectados e utilizados para gerar uma imagem da amostra (Joy e Howitt, 2003). Até 1  $\mu\text{m}$  de profundidade da amostra pode ser acessada, com informações acerca de topografia, estrutura cristalina, composição química e comportamento elétrico desta porção da amostra (Vernon-Parry, 2000).

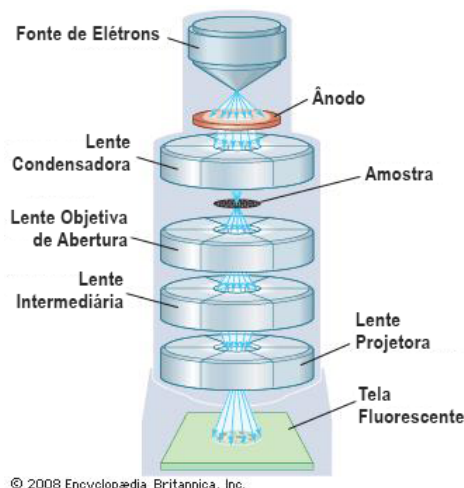


**Figura 7.** Esquema representativo de um Microscópio Eletrônico de Varredura. Adaptado de: <https://www.purdue.edu/ehps/rem/rs/sem.htm>.

Mesmo não possuindo a alta resolução provida pela Microscopia Eletrônica de Transmissão, o SEM ainda é muito utilizado para análise de nanopartículas. A possibilidade da utilização do equipamento em modo de transmissão (STEM) (Rades et al. 2014) ou em amostras líquidas (Kim et al. 2016) têm sido alternativas usadas para casos de nanopartículas que se situam perto do limite de resolução do aparelho.

### 1.3.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão

A técnica de microscopia eletrônica de transmissão (*transmission electron microscopy* – TEM) apresenta uma série de vantagens em relação ao SEM. A resolução de imagens pode chegar até 50 pm, com magnificação de 10.000.000 vezes (Erni et al. 2009). Diferentemente da microscopia de varredura, os elétrons bombardeados por uma aceleração de 40-100 kV na amostra são transmitidos pela mesma, sendo então focalizados por lentes magnéticas projetoras que produzem uma imagem em uma tela fluorescente (Williams e Barry Carter, 1996) (Figura 8).



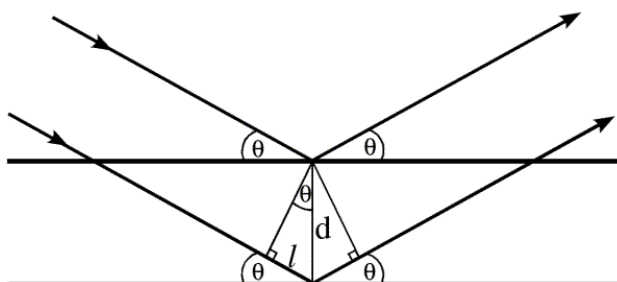
**Figura 8.** Esquema representativo de um Microscópio Eletrônico de Transmissão. Adaptado de: <https://global.britannica.com/technology/transmission-electron-microscope>.

Ao atravessar a amostra, três fenômenos básicos podem ocorrer: os elétrons podem ser elasticamente espalhados por átomos da amostra, produzindo um padrão de difração que fornece informações acerca do arranjo atômico da amostra (Schwartz et al. 2000). Também, os elétrons podem ser inelasticamente espalhados, sendo que a perda de energia é característica para cada elemento contido na amostra, o que fornece informações sobre a composição química da amostra (técnica chamada de *Electron Energy Loss* – EELS) (Koh et al. 2009). Finalmente, imagens de campo claro são produzidas por oclusão e absorção de elétrons pela amostra. Desta forma, as regiões amostrais espessas ou com átomos de alto número atômico aparecem escuras na imagem produzida.

Amostras de nanopartículas de prata são facilmente analisadas por TEM, uma vez que o preparo de amostra é muito simples, quando comparado a outros tipos de amostras. A suspensão é simplesmente colocada em um *grid* do porta-amostra e deixada para secar por período de 16 h. Esta técnica é preferencialmente utilizada para medidas precisas de tamanhos de AgNP, uma vez que imagens de alta resolução são obtidas facilmente (Bar et al. 2009) (Agnihotri, Mukherji e Mukherji, 2014), possibilitando, por vezes, também a visualização de camadas orgânicas que envolvem as nanopartículas (Ballottin et al. 2017).

### 1.3.7 Difração de raios X

A técnica de difração de raios X é utilizada para se obter informações acerca do arranjo cristalino de uma amostra em forma de pó ou filme. Planos de reflexão de átomos ordenados em celas unitárias são responsáveis pelo fenômeno de difração, que é a interferência entre ondas que ocorre quando as mesmas encontram matéria em seu caminho. O comprimento de onda de raios X (0,01-10 nm) é adequado para este fim, uma vez que é comparável à distâncias interplanares dos arranjos atômicos. Para que haja interferência construtiva entre duas ondas atingindo planos paralelos, a diferença entre caminhos deve ser dada por  $2d\sin\theta$ , onde  $d$  é a distância interplanar e  $\theta$  é o ângulo de reflexão (Figura 9). Esta distância deve então ser igual a um múltiplo inteiro do comprimento de onda dos raios X. Esta relação é chamada de Lei de Bragg e é responsável pela formação de pontos de difração que são então convertidos em um difratograma, que apresenta os ângulos de reflexão das famílias de planos encontradas em determinado material (Birkholz, 2006).



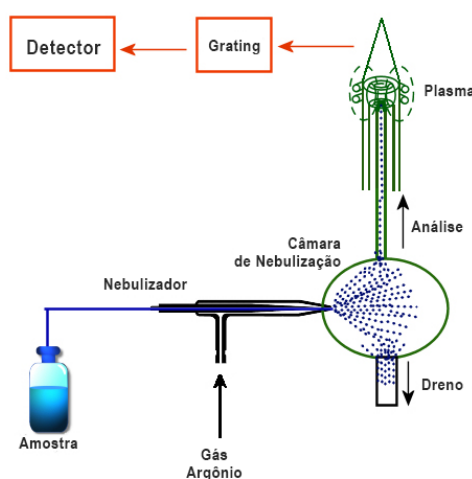
**Figura 9.** Reflexões em planos paralelos obedecendo a condição da lei de Bragg. Extraído de: [http://www-structmed.cimr.cam.ac.uk/Course/Basic\\_diffraction/Diffraction.html](http://www-structmed.cimr.cam.ac.uk/Course/Basic_diffraction/Diffraction.html) (acesso em 15/17/2017).

Na análise de nanomateriais metálicos, a difração de raios-X se torna relevante para a determinação da existência de apenas um ou mais tipos de espécies inorgânicas. De fato, no caso de nanopartículas de prata, muitas sínteses que reportam a formação de AgNP na realidade deveriam reportar a síntese de nanopartículas de Ag/AgCl, o que pode ser confirmado por esta técnica (Picoli et al. 2016). O aparecimento de óxidos de prata na superfície de AgNP também é detectado por um difratograma do material (Elzey e Grassian, 2010). Quando é a única espécie em seu meio, as AgNP se apresentam em uma estrutura cúbica de

face centrada com reflexões em  $2\theta = 38^\circ, 44^\circ, 64^\circ, 77^\circ$ , correspondendo aos planos (111), (200), (220) e (311), respectivamente (Durán, Nakazato e Seabra, 2016).

### 1.3.8 Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente

Esta técnica, comumente abreviada por ICP-OES (*Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy*), é utilizada em quantificações analíticas de metais diversos, dentre eles a prata. A amostra é inserida geralmente em meio líquido no equipamento, onde é nebulizada para formar uma fina nuvem de aerossol. Menos de 1% da amostra chega de fato ao plasma, que possui uma temperatura na faixa entre 5000 e 9000 K e é formado por íons de argônio na forma gasosa extremamente energizados por uma tocha (Figura 10). No plasma, a amostra é ionizada e excitada para níveis eletrônicos superiores, dos quais emite radiação que pode ser detectada pelos detectores do equipamento. A emissão depende do número de íons de analito e da fração deles na forma excitada, que é regida pelo fator de Boltzman,  $e^{-E/kT}$ , onde  $T$  é a temperatura,  $k$  é a constante de Boltzman e  $E$  é a energia do nível eletrônico superior (Olesik, 1991).



**Figura 10.** Esquema representativo de um equipamento de ICP-OES. Amostra deve ser nebulizada para ser introduzida no plasma sob atmosfera de argônio. Adaptado de <http://www.chemiasoft.com/chemd/node/52>.

No campo de estudo de nanopartículas de prata, esta técnica é importante do ponto de vista do rendimento da reação. Considerando que a reação

de formação de AgNP envolve a redução de íons prata, é necessário ter o conhecimento da porcentagem de íons que foram reduzidos em prata metálica. Neste caso, uma etapa de lavagem das nanopartículas as isola de íons em solução, e então uma etapa prévia de digestão em ácido (Singh et al. 2014) as torna passíveis de serem quantificadas em um equipamento de ICP-OES ou em um ICP acoplado a um espectrômetro de massas (Arruda et al. 2015).

## **1.4 Técnicas de caracterização de interações entre biomoléculas e nanopartículas de prata**

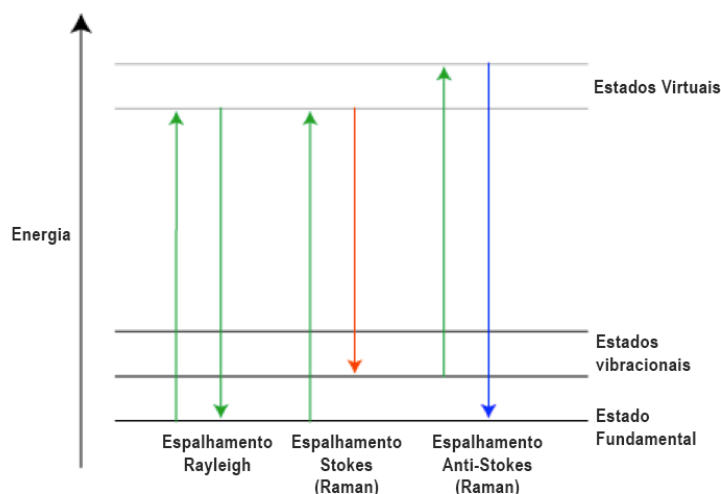
### *1.4.1 Espectrofotometria de absorção no infravermelho*

Esta técnica se baseia na irradiação de uma amostra sólida ou líquida por fótons com energia entre  $4000$  e  $400\text{ cm}^{-1}$ , que são capazes de induzir transições vibracionais e rotacionais em moléculas que possuem momento de dipolo diferente de zero (Nakamoto, 2009). Os espectrômetros mais modernos possuem uma transformada de Fourier, sendo chamados de FTIR (*Fourier transform infra red*). Os aparelhos de FTIR apresentam vantagens em relação à outros tipos (espectrômetros dispersivos e fotômetros de filtro) por possuírem uma alta sensibilidade, resolução e velocidade de aquisição de espectros. Todos os comprimentos de onda são medidos simultaneamente por meio de um interferômetro de Michelson, que gera um interferograma que é então decodificado pela transformada de Fourier (Skoog et al. 2006).

Na prática, esta técnica se apresenta muito útil para o estudo de espécies que interagem com a superfície de nanopartículas, como pequenas moléculas (Ahmed et al. 2016) ou proteínas (Sanghi e Verma, 2009). No caso de proteínas, pode-se obter informações acerca do modo de interação e da estrutura secundária por mudanças na intensidade e localização de bandas conhecidas (Jyoti, Baunthiyal e Singh, 2016).

### *1.4.2 Espalhamento Raman*

Esta técnica envolve a incidência de um laser monocromático com comprimento de onda na região do visível ou infravermelho próximo em uma amostra sólida ou em solução. Os fótons são espalhados e detectados por um detector situado a  $90^\circ$  da fonte de laser. Para que um modo vibracional seja detectável por Raman, é necessário que haja uma distorção da polarizabilidade de uma ligação, isto é, uma distorção momentânea dos elétrons envolvidos em uma ligação. Assim que elétrons do laser incidem sobre as ligações, eles podem ser espalhados com uma energia idêntica à que tinham anteriormente (espalhamento Rayleigh), ou então com uma energia menor do que possuíam (espalhamento Stokes) ou ainda, considerando que elétrons partam de um nível vibracional  $v > 0$ , eles podem ser espalhados com uma energia superior (espalhamento anti-Stokes), como mostrado na Figura 11. Como o nível vibracional  $v = 0$  é mais densamente populado à temperatura ambiente, o espalhamento Stokes é o mais comumente observado (Nakamoto, 2009).



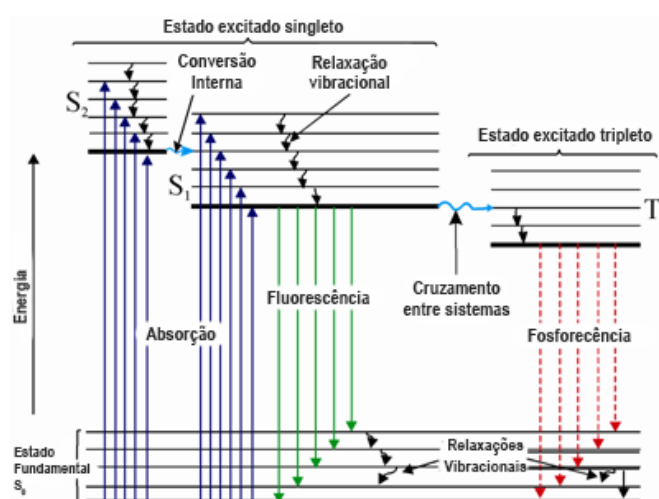
**Figura 11.** Transições eletrônicas envolvendo o estado fundamental e estados virtuais. Transições Stokes e anti-Stokes dão origem ao espalhamento Raman. Adaptado de: <https://www.doitpoms.ac.uk/tlplib/raman/printall.php>.

No caso de nanopartículas metálicas, a espectroscopia Raman encontra a vantagem do efeito SERS, que aumenta a sensibilidade e diminui a interferência de fluorescência na análise (Culha et al. 2012). A intensidade de linhas Raman de espécies ligadas à nanopartículas metálicas pode ser aumentada até  $10^{15}$  vezes por um efeito eletromagnético advindo da ressonância de plasmon de superfície e

também por um efeito de transferência de carga entre a espécie orgânica e o metal no caso de compostos quimiossorvidos (Guo et al. 2015). Desta forma, o fenômeno de SERS tem impulsionado o estudo de AgNP pela técnica de espalhamento Raman e na determinação de compostos orgânicos (Guo et al. 2016) (Li, Cheng e Chung, 2008).

#### 1.4.3 Emissão de fluorescência

A fluorescência é um fenômeno que ocorre em seguida à uma excitação eletrônica de uma espécie fluorófora. A transição eletrônica deve ocorrer com a absorção de um fóton de um estado singlete fundamental para um estado singlete excitado, no qual os elétrons continuam com *spins* emparelhados. Fenômenos de conversão interna e relaxação vibracional podem ocorrer antes da emissão de fluorescência, que sempre parte do nível vibracional mais baixo de um estado eletrônico excitado (Figura 12). Desta forma, a energia do fóton emitido na fluorescência é sempre mais baixa do que a do fóton absorvido, fazendo com que o espectro de emissão de fluorescência seja sempre deslocado para maiores comprimentos de onda em relação ao espectro de excitação (Lakowicz, 2006).



**Figura 12.** Diagrama de Jablonski, mostrando todas as transições eletrônicas e vibracionais possíveis em um sistema que pode emitir fluorescência e/ou fosforescência. Adaptado de: <https://www.quora.com/What-is-the-Jablonski-diagram>.

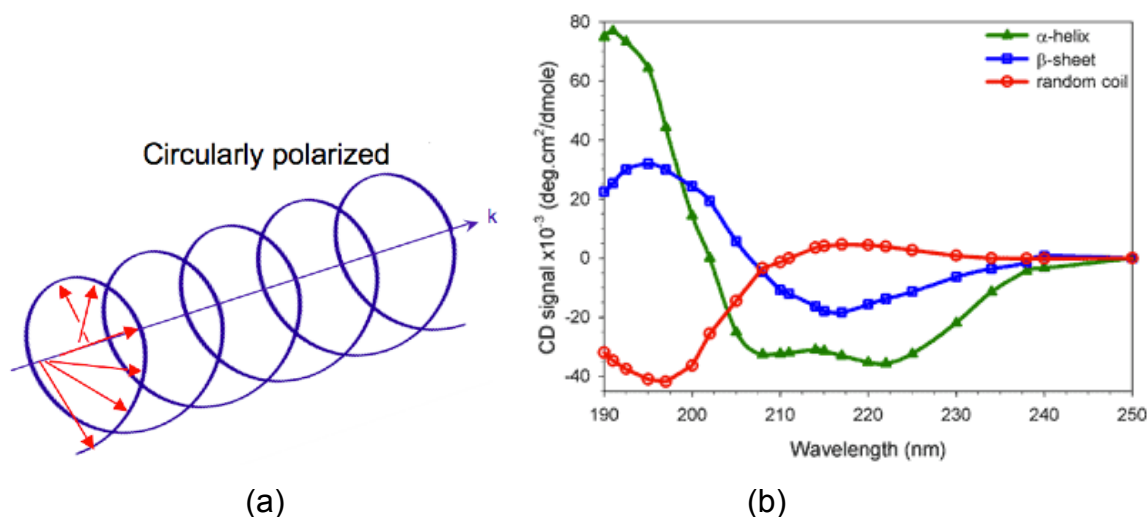


Geralmente, espécies que emitem fluorescência contêm elétrons  $\pi$  em ressonância, caracterizando um sistema aromático. Tais sistemas são comuns em pequenas moléculas encontradas na natureza, como flavonoides (Cao et al. 2014) e alcaloides (Zhang et al. 2015). No caso de macromoléculas, tais sistemas são encontrados em bases nitrogenadas de ácidos nucleicos (Vayá et al. 2010) e em algumas cadeias laterais de proteínas. Os resíduos de triptofano, tirosina e fenilalanina são responsáveis pela fluorescência de proteínas, no entanto apenas o triptofano é geralmente estudado, tendo em vista seu alto rendimento quântico ao ser excitado em 295 nm (Leach, 1969). Mudanças no enovelamento de proteínas são facilmente acessadas por mudanças na intensidade e energia de emissão do triptofano, sendo que uma maior exposição deste resíduo hidrofóbico ao solvente ocasiona um deslocamento do pico de emissão para maiores comprimentos de onda (Vivian e Callis, 2001).

As próprias nanopartículas de prata também podem apresentar fluorescência (Siwach e Sen, 2008), emitindo em aproximadamente 300 nm quando excitadas na faixa de 210-235 nm e 255-280 nm em água (Siwach e Sen, 2009).

#### *1.4.4 Dicroísmo circular*

O fenômeno de dicroísmo circular (CD, circular dichroism) é observado quando uma molécula absorve diferentemente luz polarizada circularmente para a direita e para a esquerda (Figura 13a) (Pelton e McLean, 2000). Esta técnica é aplicável apenas para compostos quirais, como pequenas moléculas com centros quirais específicos (Slade, Ferreira e Marais, 2005) ou então grandes biomoléculas como ácidos nucleicos (Miyahara, Nakatsuji e Sugiyama, 2013) e proteínas. O uso mais frequente desta técnica diz respeito à determinação da estrutura secundária de proteínas, uma vez que cada tipo de estrutura ( $\alpha$ -hélice, folha- $\beta$  e aleatória) possui um espectro de dicroísmo circular característico (Figura 13b).



**Figura 13.** (a) Na técnica de dicroísmo circular, a luz é circularmente polarizada por um laser de hélio, passando por uma cela contendo uma solução do analito. Extraído de: [https://en.wikipedia.org/wiki/Circular\\_dichroism](https://en.wikipedia.org/wiki/Circular_dichroism) (acesso em 16/07/17). (b) Espectros de dicroísmo circular característicos de cada um dos tipos de estrutura secundária de proteínas. Extraído de: <http://www.fbs.leeds.ac.uk/facilities/cd/> (acesso em 16/07/17).

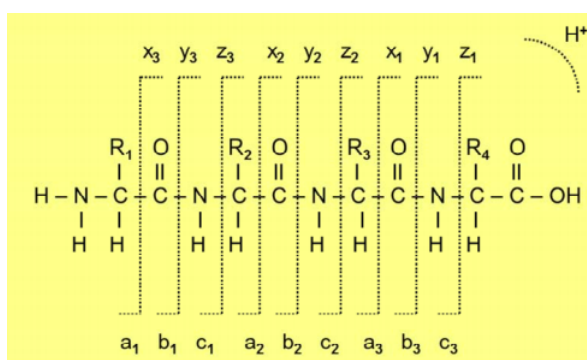
As amidas da cadeia principal de proteínas possuem transições eletrônicas do tipo  $n \rightarrow \pi^*$ , sendo responsável pela banda com o mínimo em 222 nm de estruturas de  $\alpha$ -hélice e em 216-218 nm para folhas- $\beta$ . Já a transição  $\pi_0 \rightarrow \pi^*$  origina a banda com o máximo em 190 nm e a banda com o mínimo em 208 para  $\alpha$ -hélices e a banda com o máximo em 198 nm e mínimo em 215 nm para folhas- $\beta$  (Corrêa e Ramos, 2009).

A conjugação de moléculas com nanopartículas muitas vezes pode causar o aparecimento de quiralidade, o que pode ser monitorado pela técnica de dicroísmo circular. A associação de pequenas moléculas quirais à AgNP, por exemplo, leva ao aparecimento de sinais no espectro (Li et al. 2004), bem como a ligação de peptídeos à nanopartículas de ouro (Slocik, Govorov e Naik, 2011). Além disso, a conformação e enovelamento de proteínas (Ballottin et al. 2017), bem como a estabilidade das mesmas (Laera et al. 2011) pode ser avaliada com respeito à associação com AgNP.

#### 1.4.5 Espectrometria de massas

A espectrometria de massas aplicada à proteômica é um recurso poderoso na identificação de proteínas de determinado organismo, sendo realizados estudos de proteínas presentes em tecidos específicos, ou em condições específicas, por exemplo. A análise de uma mistura complexa de proteínas pode ser feita na forma *Shotgun*, na qual não há uma separação prévia de proteínas, ou então com uma prévia separação eletroforética em uma ou duas dimensões. De qualquer forma, o espectrômetro de massas consiste em uma fonte de íons, um analisador de razão massa-carga ( $m/z$ ) e um detector (Aebersold e Mann, 2003). Eletrospray (ESI) costuma ser um dos métodos de ionização mais comuns para análises de proteínas, sendo acoplado com uma coluna de cromatografia líquida (UPLC) e ionizando os peptídeos recém saídos em solução desta coluna. O analisador mais utilizado neste contexto é o Q-Tof (*Quadrupole time-of-flight*), o qual acelera íons através de um campo elétrico produzido por um quadrupolo. A razão  $m/z$  é então calculada com base no tempo que o íon leva para se deslocar do início da câmara do quadrupolo até o detector (El-Aneed, Cohen e Banoub, 2009).

Para misturas complexas, é comum que, para cada espectro de um peptídeo, os fragmentos relativos aos sinais mais intensos sejam inseridos em uma câmara de colisão, sendo novamente fragmentados e analisados, fornecendo informações mais precisas acerca da sequência de aminoácidos de cada peptídeo (experimento do tipo LC-MS/MS). Os fragmentos então obtidos podem ser oriundos de clivagens da cadeia peptídica em pontos específicos, como mostrado na Figura 14. Os íons mais comuns em experimentos MS/MS são do tipo “b”, nos quais a carga é retida no N-terminal, e do tipo “y”, nos quais a carga situa-se no C-terminal (Roepstorff e Fohlman, 1984).

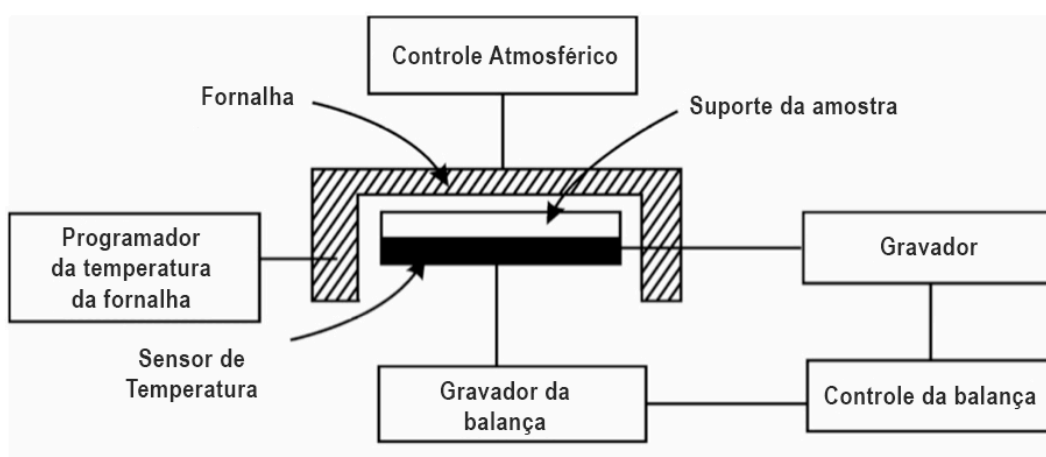


**Figura 14.** Esquema de possíveis fragmentações de uma cadeia peptídica em um experimento de MS/MS. Adaptado de Roepstorff e Fohlman (1984).

Após a obtenção de espectros MS/MS, um servidor pode então ser consultado para interpretação os dados obtidos, confrontando-os contra uma base de dados específica que contém sequências de proteínas caracterizadas e hipotéticas. O alinhamento da sequência de peptídeos com uma proteína é então feito, e à este alinhamento é dado um parâmetro (*score*). O *score* é dependente, dentre outros fatores, da cobertura da proteínas pelos peptídeos identificados, da presença de íons advindos do peptídeo, bem como do tamanho da base de dados. Quanto maior o valor de *score*, menor a probabilidade de que o alinhamento (ou *match*) tenha sido feito ao acaso ou aleatoriamente. Desta forma, o servidor retorna a análise de dados com proteínas que obtiveram um *score* maior que um limite inferior determinado pelo próprio programa ([http://www.matrixscience.com/training\\_webcast.html](http://www.matrixscience.com/training_webcast.html) - acesso em 16/07/17).

#### 1.4.6 Análise termogravimétrica

Análises termogravimétricas (*thermogravimetric analysis* – TGA) se mostram muito relevantes para o estudo de mecanismos de decomposição, determinação de pureza e análise composicional. A amostra é colocada em uma fornalha, a qual produz um gradiente de temperaturas ou uma isoterma. A massa da amostra é monitorada por uma balança de alta precisão, o que pode ser feito em atmosfera inerte (N<sub>2</sub> ou argônio) ou em atmosfera oxidativa (McMahon, 2007). Eventos térmicos são mais facilmente visualizados com gráficos da derivada da variação da massa pela temperatura (DTGA), possibilitando uma melhor interpretação dos resultados.



**Figura 15.** Esquema simplificado de um equipamento de TGA. Adaptado de: <http://lalithvarun.blogspot.com.br/2013/02/what-is-thermogravimetric-analysis.html>.

Análises termogravimétricas podem ser muito úteis para acessar quali- e quantitativamente (Mansfield et al. 2014) a presença de compostos orgânicos que interagem com nanopartículas de prata (Khan et al. 2011), especialmente no caso de sínteses biogênicas, nas quais extratos ricos em biomoléculas de todos os tipos originam as nanopartículas (Khalil et al. 2014).

### 1.5 Atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata

As AgNP são amplamente conhecidas por sua pronunciada atividade contra protozoários (Islan et al. 2017), vírus (Borrego et al. 2016), leveduras (Ballotin et al. 2017), fungos (Mallmann et al. 2015), bactérias (Durán, Nakazato e Seabra, 2016) e até contra seus respectivos vetores (Durán, Durán e de Souza, 2017). No entanto, atualmente elas são utilizadas majoritariamente como agentes antibacterianos. Há várias teorias do mecanismo de ação antimicrobiano das AgNP, que de certa forma corroboram simultaneamente para um efeito global (Prabhu e Poulouse, 2012). As nanopartículas podem se ligar à membrana celular de bactérias, danificando-a (Sondi e Salopek-Sondi, 2004) e, posteriormente, invadir a célula, onde podem interferir no funcionamento de enzimas ligadas à cadeia respiratória (Li et al. 2010). Além disso, já dentro da célula podem interagir com grupos tióis de proteínas e também com o DNA bacteriano, prejudicando a regulação gênica e a replicação da célula (Feng et al. 2000).

É preciso também considerar que AgNP liberam lentamente íons  $\text{Ag}^+$  no meio, e a existência destas duas espécies devem ser consideradas na avaliação de possíveis mecanismos (Durán et al. 2010). Ambas as espécies são responsáveis por danos na membrana celular da bactéria, sendo que tais efeitos são observados em concentrações na ordem de nanomolar para AgNPs e de micromolar para  $\text{Ag}^+$  (Lok et al. 2006). No entanto, há estudos que mostram que as nanopartículas são apenas carreadoras dos íons prata, que são liberados e produzem o efeito antimicrobiano (Xiu et al. 2012). Tanto os íons prata quanto nanopartículas são conhecidos por se ligarem facilmente à proteínas (Wigginton et al. 2010), alterando o metabolismo celular e ao DNA (Pramanik et al. 2016), influenciando na regulação gênica. Mais que isso, a literatura também aponta que dentro da célula a prata aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), levando a célula à apoptose. Este efeito é mais pronunciado quanto menor forem as nanopartículas (Onodera et al. 2015).

O grupo do Laboratório de Química Biológica (LQB) foi pioneiro em estudar a atividade bacteriostática de nanopartículas de prata biogênicas (provenientes de redução por um extrato fúngico) contra *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, demonstrando inibição na faixa dos  $6\text{--}7\ \mu\text{g mL}^{-1}$  (Ballottin et al. 2017). Neste projeto, outros tipos de nanopartículas têm suas capacidades inibitórias testadas contra a mesma bactéria causadora do cancro cítrico.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos gerais

Síntese biogênica de nanopartículas de prata utilizando resíduos de laranja da espécie *Citrus sinensis*, dentre eles, a hesperidina e a nanocelulose; estudo das interações entre estas nanopartículas e biomoléculas que as estabilizam; avaliação da atividade antibacteriana das nanopartículas sintetizadas.

### 2.2 Objetivos específicos

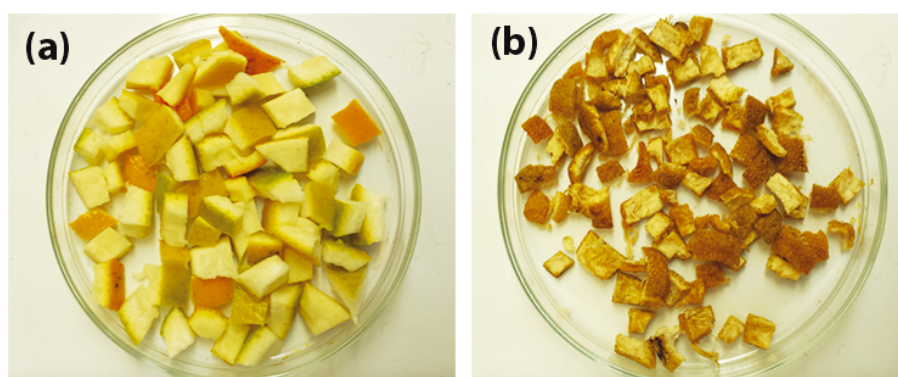
- Síntese e caracterização de nanopartículas de prata utilizando extratos aquosos de casca de laranja.
- Estudo de interações entre biomoléculas e prata utilizando técnicas espectroscópicas como UV-Vis, infravermelho, espalhamento Raman, emissão de fluorescência e dicroísmo circular, assim como também técnicas espectrométricas (LC-MS/MS) para caracterizar as proteínas envolvidas na estabilização de AgNP.
- Síntese e caracterização de nanopartículas de prata utilizando hesperidina extraída da laranja como agente redutor e nanocelulose também extraída da laranja como agente estabilizador; produção de papel de nanocelulose contendo estas nanopartículas.
- Síntese biogênica e caracterização de nanopartículas de cloreto de prata partindo de extrato bacteriano de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*.
- Avaliação da atividade antibacteriana *in vitro* das nanopartículas sintetizadas frente à culturas de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*.

### 3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

#### 3.1 Preparo de extratos e extração de biomoléculas da laranja

##### 3.1.1 Extratos aquosos de casca de laranja

Cascas de laranja da espécie *Citrus sinensis* após a obtenção do suco foram coletadas de estabelecimentos próximos ao Instituto de Química. Os resíduos foram lavados e a parte interna, mais úmida e com fibras, foi retirada. A casca da laranja foi cortada em pequenos pedaços de aproximadamente  $0,5\text{ cm}^2$ . Parte desta amostragem foi usada para o processo de obtenção do extrato, e parte foi primeiramente seca em estufa a  $60\text{-}75\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 4 h, para depois passar pelo processo de extração (Figura 16).



**Figura 16.** Cascas de laranja para preparo dos extratos aquosos, sendo (a) casca fresca e (b) casca seca (após 4 h em estufa).

Dois extratos foram feitos. O primeiro, de casca fresca, foi obtido misturando-se 50,0 g de casca fresca com 800 mL de água destilada. O sistema foi colocado em chapa de aquecimento até a ebulição, quando o aquecimento foi interrompido. Após resfriamento, o extrato foi filtrado por filtração simples para retirada de resíduos sólidos visíveis e depois por filtração à vácuo utilizando filtro de nitrato de celulose de poros de  $0,22\text{ }\mu\text{m}$ . O extrato resultante foi mantido a  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o uso. No caso do extrato de casca seca, o mesmo procedimento foi realizado, com a exceção de que foram usados 13,5 g de casca seca para 800 mL de água destilada, de forma a descontar a massa aproximada de umidade perdida durante a secagem.



### *3.1.2 Extração de hesperidina da casca da laranja*

Este procedimento foi feito baseado em um protocolo já descrito na literatura (Ikan, 1991) e modificado pelo nosso grupo de pesquisa (Tasic et al. 2013). Cascas de laranja foram secas em estufa a 60 °C, após secagem, 68 g de casca foram inseridas em um cartucho e posteriormente em aparelho extrator Soxhlet. Primeiramente, 500 mL de éter etílico foram usados para a extração de óleos essenciais por 1,5 h em refluxo. Após este pré-tratamento, metanol (500 mL) foi utilizado como solvente extrator por 4 h. A solução resultante foi evaporada em evaporador rotativo sob vácuo até a obtenção de um líquido viscoso de cor laranja-escuro. A este líquido foram adicionados 150 mL de solução 6% de ácido acético para precipitação da hesperidina. O sólido foi filtrado em funil de Büchner e lavado com água. Para obtenção de cristais puros, o sólido amarelo foi solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO, 16 mL) a 60 °C e depois 16 mL de água foram adicionados lentamente, observando-se a precipitação de hesperidina. Os cristais amarelo-pálido foram separados por filtração e lavados com água e isopropanol. Após secagem, foi obtida hesperidina com rendimento de 0,45%. A caracterização da hesperidina extraída feita por ressonância magnética nuclear (RMN) encontra-se no Apêndice 1.

### *3.1.3 Extração de nanocelulose de bagaço de laranja industrial*

Este procedimento foi desenvolvido e publicado pelo próprio grupo de pesquisa (Mariño et al. 2015). Bagaço de laranja industrial (Citrosuco, Matão, SP) foi primeiramente agitado sob ebulição em HCl 0,05 mol L<sup>-1</sup> por 1 h (17 g para 150 mL). O sólido foi hidrolisado em 100 mL de solução de NaOH 3% a 120 °C por 20 min a 1 atm em autoclave. O sólido resultante foi separado por filtração e submetido a branqueamento por duas vezes consecutivas em solução de NaClO<sub>2</sub> 3% em pH 4,5, a 70 °C por 30 min (em proporção de 1:10 de massa de sólido para volume). Após cada etapa, resíduos remanescentes foram removidos por filtração com água quente. A nanocelulose resultante foi seca em estufa até massa constante e usada para preparar uma suspensão 1% (m/v) em água destilada, sendo sonicada por 5 min em sonificador com ponteira.

### 3.2 Síntese de AgNP

As sínteses de AgNP foram realizadas utilizando  $\text{AgNO}_3$  como fonte de íons prata. As características das AgNP sintetizadas estão resumidas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Tipos de nanopartículas de prata sintetizadas

AgNP	Tipo	[AgNP] / $\mu\text{g mL}^{-1}$
1	Extrato de casca fresca	53,9*
2	Extrato de casca seca	53,9*
3	Hesperidina e nanocelulose	43,1*

\*Concentração calculada para um rendimento hipotético de 100%

No caso das AgNP sintetizadas a partir de extratos de casca fresca e seca de laranja (respectivamente AgNP 1 e 2), uma parte de solução  $\text{AgNO}_3$  1 mmol  $\text{L}^{-1}$  foi adicionada à uma parte de extrato de laranja, seguido de leve agitação em *shaker* horizontal por 2 h. Para a AgNP 3, primeiramente foi feita solução de nanocelulose 0,01% em água, que foi filtrada usando filtro de nitrato de celulose (0,22  $\mu\text{m}$ ) acoplado a seringa para eliminação de partículas micrométricas e milimétricas. À duas partes desta solução, foram adicionadas duas partes de solução  $\text{AgNO}_3$  (1 mmol  $\text{L}^{-1}$ ) e a mistura foi colocada em banho de ultrassom por 15 min. À esta solução, foi adicionada uma parte de solução de hesperidina (2,0 mg  $\text{mL}^{-1}$  em NaOH 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$ ) sob agitação.

### 3.3 Caracterização de AgNP

#### 3.3.1 Espectroscopia na região do UV-Vis

Análises de absorção na região do ultravioleta-visível foram conduzidas em espectrofotômetro HP8453, na região de 200 a 1000 nm utilizando cubeta de quartzo com 1 cm de caminho óptico. Para o experimento de cinética, foi utilizado aparelho controlador de temperatura Peltier para manutenção da temperatura em 25 °C durante 48 h.

### 3.3.2 Análises de espalhamento de luz e potencial zeta

Um equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) foi utilizado para análise de espalhamento de luz das amostras e também de potencial zeta, de posse de uma cubeta do tipo DTS1070. Para as análises de potencial zeta, as amostras foram diluídas em 1:20 (v/v) em água Milli-Q. Todas as medições foram feitas em triplicata, com 15 corridas cada uma à temperatura de 25 °C. As médias e valores de desvio padrão correspondem ao cálculo aritmético envolvendo as três medidas de cada amostra.

### 3.3.3 Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)

Medidas de NTA foram obtidas em um equipamento NanoSight LM10 (Nanoparticle Analysis System, Malvern Instruments) equipado com uma câmara de amostra contendo um laser de 640 nm. As amostras de AgNP foram diluídas com água Milli-Q (na proporção 1:10) de forma à chegar a uma concentração aceitável pelo *software* do equipamento (entre  $10^7$  e  $10^9$  partículas  $\text{mL}^{-1}$ ) e então injetadas na câmara de amostra com uma seringa de plástico de 1 mL até completar o volume interno. Todas as medidas foram feitas à temperatura ambiente. A captura e análise de dados foi feita pelo *software* NTA 2.0 Build 127. As médias e valores de desvio padrão correspondem ao cálculo aritmético envolvendo os valores de tamanho de um vídeo de captura de 60 segundos.

### 3.3.4 Difração de raios X

Amostras de AgNP 1 e 3 foram previamente liofilizadas e analisadas em difratômetro de raios X DRX7000 (Shimadzu) usando radiação de cobre  $K\alpha = 1,54 \text{ \AA}$ , 40 kV e 30 mA na região de  $2\theta = 30^\circ$  a  $2\theta = 80^\circ$ . Para a amostra de nanocelulose, foram utilizados os mesmos parâmetros, porém na janela entre  $2\theta = 5^\circ$  a  $2\theta = 50^\circ$ .

### 3.3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura

Amostras de AgNP1 e 2 previamente liofilizadas foram usadas para obtenção de micrografias em equipamento Quanta 250 (FEI Ltda) com *Field Emission Gun* e 5,00 kV. As amostras foram depositadas em fita de carbono e a metalização foi conduzida usando irídio.

### 3.3.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Amostras de AgNP 1-3 foram diluídas na proporção de 1:3 (v/v) em água deionizada e depositadas no porta-amostra. Um Microscópio Eletrônico de Transmissão modelo Libra 120 (Carl Zeiss) foi utilizado para conduzir as análises, utilizando voltagem de 80 kV. Para gerar imagens com perda de energia (*Energy-filtered Transmission Electron Microscopy*), foi utilizado critério de perda de energia de 25 eV.

### 3.3.7 Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES)

Para avaliar o rendimento das reações de formação de nanopartículas, amostras de AgNP 1-3 foram utilizadas de duas formas: nanopartículas em sua suspensão original e lavadas (ultracentrifugação a 14000 rpm por 30 min a 25 °C, seguida de remoção do sobrenadante e re-suspensão em água destilada no mesmo volume). Como o procedimento de lavagem isola as nanopartículas, é possível então verificar qual porcentagem de íons prata originalmente na solução foi convertida em nanopartículas. Foi realizado um tratamento prévio das amostras por digestão com ácido, no qual 500 µL de HNO<sub>3</sub> concentrado foram adicionados à 500 µL de amostra. A mistura foi deixada em repouso por 24 h para completa digestão das nanopartículas, e então foram adicionados 9,0 mL de água Milli-Q, totalizando 10,0 mL. A curva de calibração foi feita utilizando solução padrão para ICP de prata 1000 µg L<sup>-1</sup> em 2-5% HNO<sub>3</sub> (Grupo Química), que foi diluída com água Milli-Q de forma a atingir as concentrações de 0,1, 0,5, 1,0, 2,0, 5,0 e 7,5 µg L<sup>-1</sup> (ou ppm). As análises foram conduzidas em triplicata em um espectrômetro de emissão óptica por plasma indutivamente acoplado Perkin Elmer – Optima 8300.

### 3.4 Estudo das interações em AgNP

#### 3.4.1 Método de Bradford de quantificação de proteínas

Este método foi desenvolvido por Marion Bradford em 1976 (Bradford, 1976) e baseia-se na atuação do corante *Coomassie Blue*, que ao complexar com proteínas em solução, muda de cor vermelha-marrom para a cor azul brilhante. Uma curva de calibração foi feita utilizando solução estoque de albumina de soro bovino (BSA), adicionando diferentes volumes desta solução estoque à 200  $\mu\text{L}$  de reagente de Bradford (que contém *Coomassie Blue*) e completando para 1000  $\mu\text{L}$  com água Milli-Q. Cada ponto foi feito em triplicata. Para a análise das amostras (extratos e AgNPs 1 e 2), o mesmo procedimento foi feito, usando 600  $\mu\text{L}$  de amostra, 200  $\mu\text{L}$  de água e 200  $\mu\text{L}$  de reagente de Bradford, também em triplicata. No caso das suspensões de AgNP, foi feito um tratamento prévio com ultracentrifugação por 30 min a 14000 rpm e 25 °C. Foi utilizado para o ensaio apenas a porção sobrenadante, que é onde as proteínas do extrato que não se ligaram às AgNP ficam após o procedimento de lavagem. As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro (Femto Cirrus 80MB) com leitura em 595 nm, esperando 5 min para a leitura de cada amostra após o preparo da solução.

#### 3.4.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE 15%)

Foi realizada uma corrida de eletroforese utilizando extrato de casca fresca, suspensão de AgNP correspondente e padrão de peso molecular. Foi preparado gel de separação contendo 2,5 mL de tampão pH 8,8, 4,0 mL de solução de acrilamida 30%, 100  $\mu\text{L}$  de solução 0,1 g mL<sup>-1</sup> de persulfato de amônio (APS), 100  $\mu\text{L}$  de dodecil sulfato de sódio (SDS) 10%, 17  $\mu\text{L}$  de tetrametiletenodiamina (TEMED) e 3,3 mL de água destilada. O gel de empacotamento consistiu em 630  $\mu\text{L}$  de tampão pH 6,8, 900  $\mu\text{L}$  de solução de acrilamida 30%, 50  $\mu\text{L}$  de solução 0,1 g mL<sup>-1</sup> de persulfato de amônio (APS), 50  $\mu\text{L}$  de dodecil sulfato de sódio (SDS) 10%, 10  $\mu\text{L}$  de tetrametiletenodiamina (TEMED) e 3,4 mL de água destilada. A amostra foi misturada em vortex com igual volume de tampão de amostra (15  $\mu\text{L}$  + 15  $\mu\text{L}$ ) contendo corante e a corrida foi realizada por 1,5 h, utilizando 180 V. Após o

término, o gel foi corado por 30 min com corante *Coomassie Blue* e depois descorado com solução aquosa contendo 10% de ácido acético glacial e 40% de etanol.

#### 3.4.3 Espectroscopia de emissão de fluorescência

As análises foram conduzidas em espectrofluorímetro (Varian CARY Eclipse), utilizando fendas de emissão e de excitação de 5 nm. A amostra de extrato de casca fresca foi diluída com igual volume de água destilada, para que ficasse com mesma concentração de proteínas da suspensão de AgNP correspondente (AgNP 1). As amostras foram excitadas em 280 nm, analisando a emissão na janela de 300 nm a 500 nm.

#### 3.4.4 Espectroscopia no infravermelho

AgNP de extrato de casca fresca (AgNP 1) foi lavada por centrifugação a 5000 rpm por 30 min 3 vezes e suspendida em água. A suspensão resultante e o extrato de casca fresca foram liofilizados e então analisados em espectrofotômetro (Agilent CARY 630 FTIR no modo ATR), de  $4000\text{ cm}^{-1}$  a  $400\text{ cm}^{-1}$  com 64 *scans* e resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$ . De forma análoga, amostras de nanocelulose de bagaço industrial, hesperidina e AgNP 3, liofilizadas, tiveram seus espectros obtidos.

#### 3.4.5 Espalhamento Raman

Amostras liofilizadas de extrato de casca fresca e AgNP 1 correspondente foram analisadas quanto ao espalhamento Raman produzido com a incidência de laser de 632,8 nm (espectrômetro Horiba T64000) e analisando a janela de  $100\text{ cm}^{-1}$  a  $900\text{ cm}^{-1}$ . Também foi utilizado Micro Raman XploRa com laser de 785 nm para analisar espalhamento na região entre  $100\text{ cm}^{-1}$  e  $4000\text{ cm}^{-1}$ .

#### 3.4.6 Dicroísmo circular

Amostra de extrato fresco foi dialisada por dois dias (membrana de massa molecular de corte de 6000-8000 Da) contra tampão acetato 10 mmol L<sup>-1</sup> pH 4 para eliminação de pequenas moléculas quirais que poderiam interferir na análise das proteínas. A suspensão AgNP 1 correspondente foi lavada uma vez por centrifugação a 14000 rpm por 30 min a 25 °C, seguido de resuspensão em água Milli-Q no mesmo volume. As análises foram feitas em um espectropolarímetro JASCO J-720 e os espectros foram adquiridos na região entre 260 e 190 nm, na velocidade de 20 nm/min e 8 acumulações. As amostras foram analisadas em cubetas de quartzo de 0,1 cm.

### 3.4.7 Espectrometria de massas

Análises desta etapa foram realizadas no grupo de espectrometria de massas (MAS) do Laboratório Nacional de Biociências – LNBio do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais - CNPEM (número de proposta MAS-21531). O preparo de amostra demandou a produção de extrato de casca fresca de laranja e AgNP correspondente de forma específica, de forma a aumentar a concentração de proteínas no amostra.

Como já descrito no item 3.1.1, um extrato aquoso de casca fresca de laranja foi feito, porém desta vez utilizando 150 mL de água destilada. Após as etapas usuais de filtração, as proteínas foram precipitadas por adições sucessivas de sulfato de amônio à 20 mL do extrato sob agitação moderada à temperatura ambiente. Ao primeiro sinal de turbidez e formação de precipitado, a solução foi deixada por 16 h em uma temperatura de 4 °C para completa precipitação. Em seguida, a mistura foi centrifugada (5000 rpm, 10 min, 25 °C) e o sobrenadante foi retirado. O precipitado de proteínas foi então dissolvido em 5 mL de tampão acetato 10 mmol L<sup>-1</sup> pH 4 e dialisado contra o mesmo tampão para remoção de excesso de sal utilizando uma membrana semipermeável de peso molecular de corte 6000-8000 Da (troca de tampão foi realizada duas vezes, a cada duas horas, e em seguida 16 h a uma temperatura de 4 °C). A solução de proteínas resultante foi então quantificada pelo método de Bradford, estando pronta para a etapa de digestão. O mesmo extrato foi utilizado (antes da etapa de precipitação de proteínas) para síntese de AgNP de forma análoga ao já descrito anteriormente. Após dois dias, 40 mL da suspensão de AgNP foram ultracentrifugados (14000 rpm, 30 min, 25 °C) e

posteriormente re-suspensos em 4 mL de água destilada. Esta suspensão então foi submetida à etapa de digestão de proteínas.

A etapa de digestão foi feita utilizando-se 200  $\mu\text{L}$  de amostra (de proteínas do extrato e de proteínas ligadas à AgNP). À este volume, foram adicionados 5  $\mu\text{L}$  de solução de ditioneína (DTT) 10  $\text{mmol L}^{-1}$  (em bicarbonato de amônio 100  $\text{mmol L}^{-1}$ ), seguido de incubação à 60 °C por 30 min. Em seguida, 5  $\mu\text{L}$  de iodoacetamida (IAA) 50  $\text{mmol L}^{-1}$  (em bicarbonato de amônio 100  $\text{mmol L}^{-1}$ ) foram adicionados e incubação foi feita por 30 min em temperatura ambiente sob proteção da luz. Após este período, a mistura foi deixada por 10 min em contato com a luz ambiente para degradação de IAA residual. Finalmente, 0,4  $\mu\text{L}$  de uma solução gelada de tripsina (*Sequencing Grade Modified Trypsin*, Promega) de concentração 20  $\text{ng mL}^{-1}$  em bicarbonato de amônio 50  $\text{mmol L}^{-1}$  foi adicionado, seguido de incubação a 37 °C por 16 horas. Após este período, ácido fórmico foi adicionado de forma a chegar numa concentração final de 1% e a mistura foi congelada a -20 °C até a continuação do procedimento (no caso da amostra contendo AgNP, as nanopartículas foram separadas do meio por ultracentrifugação).

As amostras então tiveram seus peptídeos isolados por meio da utilização de cartuchos de extração em fase sólida (SPE) da marca Oasis HLB (Waters) com capacidade para 1 mL e recheio de  $\text{C}_{18}$ . Primeiramente, os cartuchos foram condicionados com a eluição de 1 mL de acetonitrila com 0,1% ácido fórmico (v/v), seguido de 1 mL de água com 0,1% ácido fórmico (v/v). As amostras foram então inseridas no cartucho e então dessalinizadas pela eluição de 1 mL de água com 0,1% ácido fórmico (v/v) e, finalmente, os peptídeos foram eluídos com a adição de 1 mL de acetonitrila com 0,1% ácido fórmico (v/v). Esta última eluição, a qual contém os peptídeos de interesse, foi submetida à secagem à vácuo em um concentrador SpeedVac (Thermo Scientific) até eliminação total do solvente. A partir desta etapa, todo o procedimento foi realizado no grupo de Espectrometria de Massas do Laboratório Nacional de Biociências. As amostras foram então dissolvidas com auxílio de um vortex em 8  $\mu\text{L}$  de água contendo 0,1% ácido fórmico (v/v), seguido de centrifugação por 10 minutos a 5000 rpm. O sobrenadante foi então transferido para *vials* e submetidos às análises de LC-MS/MS. Em uma coluna do tipo  $\text{C}_{18}$  (100 mm 6100 mm) RP-nanoUPLC (nano Acquity, Waters), 4,5  $\mu\text{L}$  de amostra foi submetida à separação cromatográfica acoplada à espectrômetro de massas Q-Tof Premier com fonte do tipo nanoeletrospray em um fluxo de 0,6  $\text{mL min}^{-1}$ . O gradiente utilizado foi



de 2-90% acetonitrila com 0,1% ácido fórmico (v/v) durante 90 minutos. A voltagem do nanoeletrospray foi configurada para 3,5 kV, a voltagem do cone de 30 V e a temperatura da fonte foi de 100 °C. Foi realizado o modo “*top three*”, no qual um espectro de massas (MS) é obtido seguido de MS/MS dos três picos mais intensos detectados. Após fragmentação MS/MS, o íon foi colocado em lista de exclusão por 60 segundos. Este procedimento foi otimizado do descrito na literatura (Aragão et al. 2012).

Os espectros foram analisados pelo *software* MassLynx v.4.1 e os arquivos foram convertidos para um formato de lista de picos (mgf) sem somar os *scans* pelo *software* Mascot Distiller v.2.3.2.0, 2009 (Matrix Science Ltd.) e a busca de proteínas foi feita utilizando o banco de dados CitrusSinensis2017 (88149 sequências, 36207566 resíduos) utilizando o Mascot Engine v.2.3.01 (Matrix Science Ltd.) com carbamidometilação como modificação fixa, oxidação do resíduo de metionina como modificação variável, uma clivagem perdida de tripsina e tolerância de 0,1 Da tanto para íon precursor quanto para fragmentos.

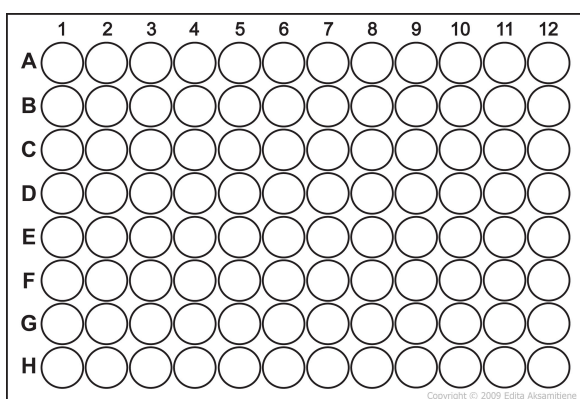
Além da identificação de proteínas provida pelo Mascot Engine v.2.3.01, os *ion scores* com valor acima de 10 foram manualmente alinhados utilizando a ferramenta Protein BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) utilizando como base de dados sequências de proteínas não redundantes de organismos do gênero *Citrus* (taxid: 2706), matriz PAM30 e *Expect threshold* de 2000. Foram identificadas apenas proteínas com 100% de identidade e cobertura da sequência peptídica submetida.

### 3.5 Ensaios de Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para avaliar a capacidade bacteriostática das AgNP produzidas frente à culturas de *Xac*, foram utilizadas placas de 96 poços. Antes do experimento, foram preparados 100 mL de meio de cultura previamente esterilizado por autoclave por 15 min a 1 atm e 120 °C contendo peptona (10 g L<sup>-1</sup>) e extrato de levedura (5 g L<sup>-1</sup>) em pH 7,5. Após resfriamento do meio de cultura estéril, foi adicionado ampicilina (em solução água:etanol 1:1) de forma que a concentração final fosse de 50 µg mL<sup>-1</sup>. Um volume de 300 µL de cultura de *Xac* (cepa 306, IBSBF 1594) líquida conservada a -

80 °C com glicerol foi usado para inóculo. A cultura foi mantida a 200 rpm e 32 °C por 20 h e posteriormente utilizada para os ensaios.

Para os ensaios de CIM, cada coluna da placa continha uma determinada concentração de AgNP. Desta forma, da coluna 12 à 4 (Figura 17), foram feitas soluções de concentrações crescentes de AgNP, sempre diluindo a solução estoque com meio de cultura estéril, totalizando 200 µL. À cada um destes poços foram adicionados 50 µL de solução 0,9% NaCl previamente autoclavada contendo *Xac*, de forma que a absorbância da solução a 530 nm foi de 0,1, que por sua vez corresponde à faixa de  $10^8$  a  $10^{10}$  Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por mL, pela escala McFarland.



**Figura 17.** Esquema de placa de 96 poços utilizada nos ensaios de CIM.

A coluna 1 foi designada como controle positivo, contendo 100 µL de solução salina de *Xac* e 100 µL de meio de cultura. A coluna 2 foi designada como controle negativo, sendo preenchida com 100 µL de meio de cultura e 100 µL de solução estoque de AgNP. À coluna 3 foi adicionada a suspensão de AgNP em sua concentração original. Cada ensaio foi feito em triplicata (3 placas de 96 poços esterilizadas) em capela de fluxo laminar e a incubação foi realizada por 48 h a 35 °C.

### 3.6 Formulação de agroquímico contendo AgNP

A AgNP 1 (de casca fresca de laranja) foi utilizada para a formulação de um produto que fosse apropriado para futuros testes *in vivo* em plantações de laranja afetadas pelo cancro cítrico. Para tanto, foi utilizado o oleato de sorbitano (ou

Span® 80) na proporção de 0,05% (v/v) para diminuição da tensão superficial e glicerol na proporção de 0,2% (v/v) para aumento da viscosidade. Foram realizadas outras medidas de potencial zeta e DLS, de forma análoga ao descrito no item 3.3.2 para verificação de possíveis perturbações no sistema coloidal pelos adjuvantes selecionados. Além disso, medidas de tensão superficial foram realizadas utilizando um tensiômetro Sigma 701 (Dyne Testing – UK). Verificação visual das modificações no espalhamento do produto foram feitas utilizando folhas de planta do gênero *Citrus*.

### 3.7 Produção e caracterização de filmes de nanocelulose contendo nanopartículas de prata

#### 3.7.1 Produção de filmes de nanocelulose

Nanocelulose extraída de bagaço industrial (como descrito no item 2.1) foi utilizada também para produzir um papel que pudesse ter aplicações antibacterianas ou antifúngicas. Foram produzidos filmes de acordo com o descrito na Tabela 2.

**Tabela 2.** Filmes de nanocelulose produzidos

Filme	Tipo
1	Nanocelulose 1% (m/v)
2	Nanocelulose 1% (m/v) + PVA 1% (m/v)
3	Nanocelulose 1% (m/v) + PVA 1% (m/v) + AgNP 3

O Filme 1 foi feito utilizando uma suspensão de nanocelulose a 1% (m/v) em água destilada, que foi dispersa em sonicador com ponteira por 30 s. A suspensão (20 mL) foi deixada em superfície lisa de papel alumínio utilizando uma placa de Petri de vidro como suporte físico. A evaporação da água transcorreu durante 2 dias, e então o filme foi destacado da superfície com auxílio de uma espátula e temperatura branda de aproximadamente 40 °C (obtida com uma chapa aquecedora). O Filme 2 foi realizado de forma análoga, porém adicionando 1% (m/v) de álcool polivinílico (PVA) à suspensão inicial de nanocelulose, como forma de reforçar suas características de material dobrável e resistente à estresse mecânico.

No caso do Filme 3, as nanopartículas de prata obtidas a partir de hesperidina e nanocelulose (AgNP 3) foram escolhidas por possuírem maior compatibilidade com o material (uma vez que contém nanocelulose em sua capa orgânica). A suspensão de nanocelulose de PVA foi feita utilizando a metade do volume de água (e, portanto, concentração de 2%) para que as nanopartículas não fossem submetidas à ultrasonicação. Em seguida, um volume igual (proporção 1:1, v/v) da suspensão de AgNP 3 lavadas foi adicionado, resultando em uma suspensão contendo 1% de nanocelulose, 1% de PVA e  $21,55 \mu\text{g mL}^{-1}$  de AgNP 3. O filme foi produzido da mesma forma, porém com um maior cuidado no manuseio da suspensão, de forma que não houvesse incidência de luz na suspensão durante a secagem.

### 3.7.2 Caracterização dos filmes de nanocelulose

Os filmes foram analisados quanto aos seus espectros de infravermelho em um equipamento Agilent CARY 630 (FTIR no modo ATR), de  $4000 \text{ cm}^{-1}$  a  $400 \text{ cm}^{-1}$  com 64 *scans* e resolução de  $4 \text{ cm}^{-1}$ . Difração de raios X foi realizada em um difratômetro de raios-X DRX7000 Shimadzu usando radiação de cobre  $K\alpha = 1,54 \text{ \AA}$ , 40 kV e 30 mA na região de  $2\theta = 5^\circ$  a  $2\theta = 80^\circ$ . Imagens por Microscopia Eletrônica de Varredura foram obtidas em um microscópio Quanta 250 (FEI Ltda) com *Field Emission Gun* e 2,00 kV, usando ouro na metalização da amostra. Análises termogravimétricas foram realizadas em um equipamento STD q600 (TA Instruments), utilizando rampa de temperatura de  $10,0^\circ\text{C}$  por minuto até  $800,0^\circ\text{C}$  em atmosfera de nitrogênio.

### 3.8 Síntese e caracterização de nanopartículas de cloreto de prata (AgCl NP) a partir de extrato de proteínas extracelulares de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

Por mais que o escopo principal desta dissertação se atenha mais à produção de nanopartículas de prata a partir de rotas envolvendo extratos vegetais e compostos extraídos de casca de laranja, foi estudada também, por uma rota biogênica, a biossíntese de nanopartículas envolvendo a bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac).

### 3.8.1 Síntese de nanopartículas de cloreto de prata

Uma cultura líquida de *Xac* (cepa 306, IBSBF 1594) foi preparada em 100 mL meio de cultura contendo peptona ( $10 \text{ g L}^{-1}$ ) e extrato de levedura ( $5 \text{ g L}^{-1}$ ) em pH 7,5 previamente esterilizado em autoclave por 15 min a 1 atm e  $120^\circ\text{C}$ . Após resfriamento do meio de cultura estéril, foi adicionado ampicilina (em solução água:etanol 1:1, v/v) de forma que a concentração final fosse de  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ . O inóculo foi feito utilizando 300  $\mu\text{L}$  de meio de cultura contendo *Xac* conservada com glicerol a  $-80^\circ\text{C}$ . Após 20 h de incubação em um shaker de agitação orbital a 200 rpm e  $32^\circ\text{C}$ , a cultura resultante de *Xac* foi centrifugada a 5000 rpm por 10 min a  $25^\circ\text{C}$  e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* de células foi disperso na metade de volume de água destilada e colocado em agitador horizontal por 2 h. Uma nova etapa de centrifugação (5000 rpm, 10 min,  $25^\circ\text{C}$ ) foi feita e o sobrenadante foi retirado e reservado, ao passo que o *pellet* foi descartado. O sobrenadante foi filtrado em filtro de nitrato de celulose de poros de  $0,22 \mu\text{m}$  para eliminar partículas que possam ter permanecido suspensas, resultando em um extrato extracelular bacteriano. À uma parte deste extrato, foi adicionada uma parte de solução de  $\text{AgNO}_3$   $1 \text{ mmol L}^{-1}$ . A mistura foi deixada em repouso sob proteção da luz.

### 3.8.2 Caracterização de nanopartículas de cloreto de prata

Análises de determinação de tamanho por espalhamento de luz e de potencial zeta foram realizadas em um Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) em triplicata, com 15 corridas em cada análise em uma cubeta DTS1070 de 1 mL. Difração de raios-X foi conduzida com amostra liofilizada de AgCl NP na janela de  $2\theta = 30^\circ$  a  $2\theta = 80^\circ$  em um Shimadzu DRX7000 utilizando radiação de cobre com  $K\alpha = 1,54 \text{ \AA}$ , 40 kV e 30 mA. Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão foram obtidas em um Libra 120 (Carl Zeiss) com voltagem de 80 kV. A amostra foi com diluída na proporção de 1:3 (v/v) em água deionizada e depositada no porta-amostra.

Para elucidação de interações de biomoléculas presentes no extrato bacteriano com as nanopartículas, foi realizada quantificação de proteínas pelo método de Bradford de forma análoga ao apresentado no item 2.4.1. Espectroscopia na região do infravermelho foi realizada com amostras liofilizadas de extrato

bacteriano e AgCl NP correspondente em um Agilent CARY 630 (FTIR no modo ATR) na região de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , com 64 *scans* e resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ . Espectros de emissão de fluorescência foram obtidos em um espectrofluorímetro Varian CARY Eclipse, utilizando fendas de emissão e de excitação de 5 nm. Amostra de extrato bacteriano foi diluída com igual volume de água destilada, para que ficasse com mesma concentração de biomoléculas da suspensão de AgCl-NP correspondente. A excitação foi feita em 280 nm, analisando a emissão na janela de 300 nm a 500 nm.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Caracterização das AgNP produzidas

Um resumo das características de tamanho e potencial zeta das nanopartículas de prata produzidas e o rendimento de cada processo são apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Dados de rendimento, tamanho e potencial zeta das AgNP produzidas

AgNP	Tipo	Rendimento	Diâmetro médio / nm (DLS)	Polidispersidade (DLS)	Diâmetro médio / nm (NTA)	Diâmetro médio / nm (TEM)	Potencial zeta / mV
1	Extrato casca fresca	83%	239 $\pm$ 1	0,287	210 $\pm$ 105	48,1 $\pm$ 20,5	-19,0 $\pm$ 0,4
2	Extrato casca seca	48%	196 $\pm$ 8	0,189	139 $\pm$ 44	40,7 $\pm$ 16,2	-16,7 $\pm$ 0,8
3	Hesperidina e nanocelulose	99%	114 $\pm$ 1	0,314	100 $\pm$ 39	25,4 $\pm$ 12,5	-28,2 $\pm$ 1,0

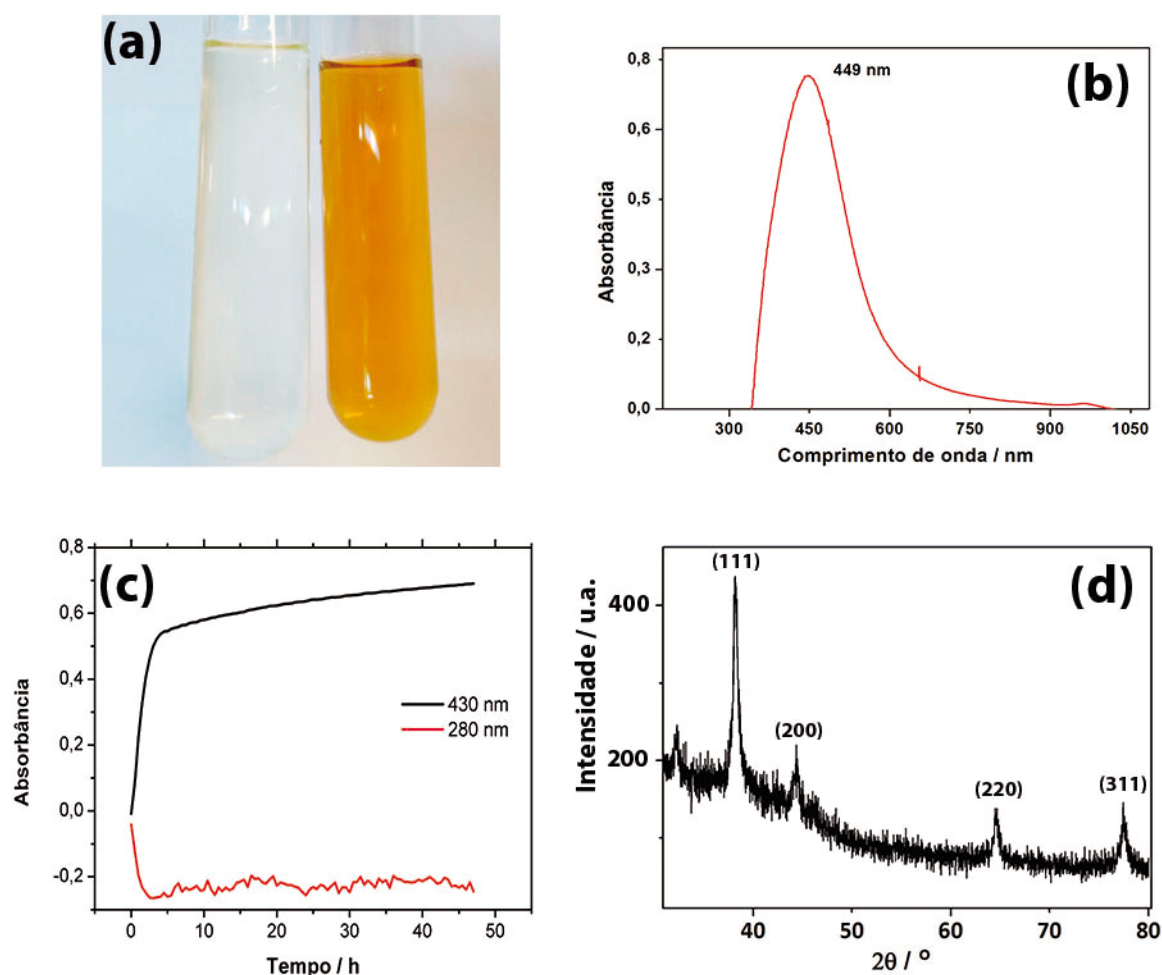
*\*Relatórios de distribuição de tamanho por DLS e potencial zeta são apresentados no Apêndice 2.*

*\*\*Relatórios de análises por NTA são apresentados no Apêndice 3.*

A primeira característica notável que distingue as nanopartículas feitas por um processo inteiramente biogênico (utilizando extratos) daquelas feitas por um processo químico é a diferença nos valores de rendimento, que foram obtidos pela técnica de ICP-OES (curva de calibração encontra-se no Apêndice 4). O alto rendimento da AgNP 3 era de certa forma esperado, visto que na reação é colocado o agente redutor em excesso em relação ao sal de prata. No entanto, as reações envolvendo extratos possuem um menor rendimento justamente por haver um controle menor da quantidade (e tipo) de compostos redutores em solução. A secagem prévia da casca parece ser um processo que afeta a concentração de

compostos redutores extraídos, como seria o caso do ácido ascórbico, que se oxida facilmente em contato com o oxigênio e já foi reportado como produtor de nanopartículas de prata (Malassis et al. 2016).

A AgNP 1 se mostrou estável durante 3 meses, mantendo suas características de tamanho, potencial zeta e cor (Figura 18a). Seu tamanho médio é referente ao núcleo metálico somado à corona de biomoléculas e a camada de hidratação, sendo que é a maior AgNP produzida dentre as três apresentadas. Enquanto a técnica de DLS mostra uma distribuição de tamanhos unimodal, a técnica de NTA com sua maior resolução, mostra uma ampla faixa de tamanhos existentes na suspensão. Um dos aspectos diagnósticos da formação de nanopartículas de prata é a existência de uma banda de ressonância de plasmon de superfície situada entre 400 e 450 nm, correspondente à cor amarelo-alaranjada da solução (Figura 18b). A cinética da reação (Figura 18c) demonstra que a reação chega à quase estagnação após 47 h. A queda da absorção em 280 nm na mesma taxa que o crescimento observado da banda em 430 nm pode sugerir que compostos aromáticos ou fenólicos que absorvem luz neste comprimento de onda podem ter sido consumidos durante a síntese de AgNP.

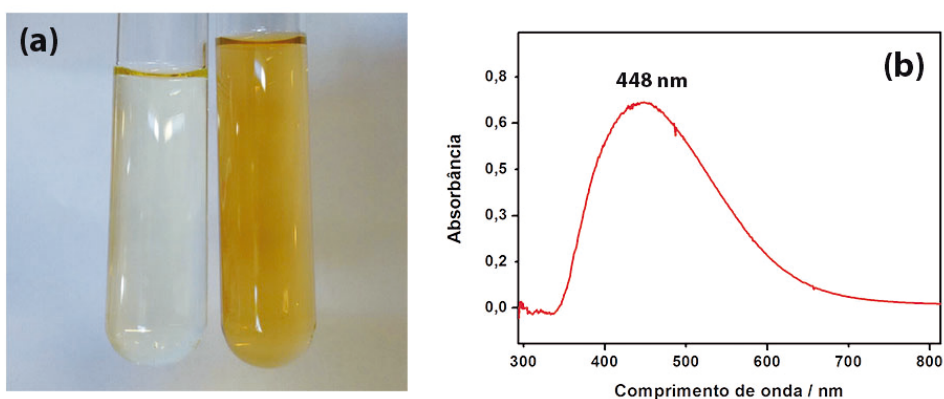


**Figura 18.** AgNP produzidas a partir de casca fresca de laranja; (a) diferença de coloração entre extrato (esquerda) e AgNP; (b) espectro no UV-Vis, com banda de ressonância de plasmon de superfície em 449 nm (após 48 h); (c) cinética da reação, com monitoramento de espectros acumulados ao longo de 48 h partindo do início da reação, com obtenção de espectro de meia em meia hora em 430 nm e em 280 nm e (d) difratograma de raios X, com janela de  $2\theta = 30^\circ$  até  $2\theta = 80^\circ$ .

O difratograma de raios-X (Figura 18d) mostra os principais picos de difração da prata cristalina, sendo eles em  $38,14^\circ$ ;  $44,36^\circ$ ;  $64,64^\circ$  e  $77,44^\circ$ , que correspondem aos planos de reflexão (111); (200); (220) e (311), respectivamente. Estes picos confirmam que a prata produzida segue o padrão de sistema cúbico de face centrada (Mukherjee, et al., 2008). O pico em  $32,28^\circ$  corresponde ao plano (111) de óxido de prata, que pode ter sido formado na superfície das nanopartículas uma vez que a reação não foi feita em meio inerte (Feng et al. 2010).

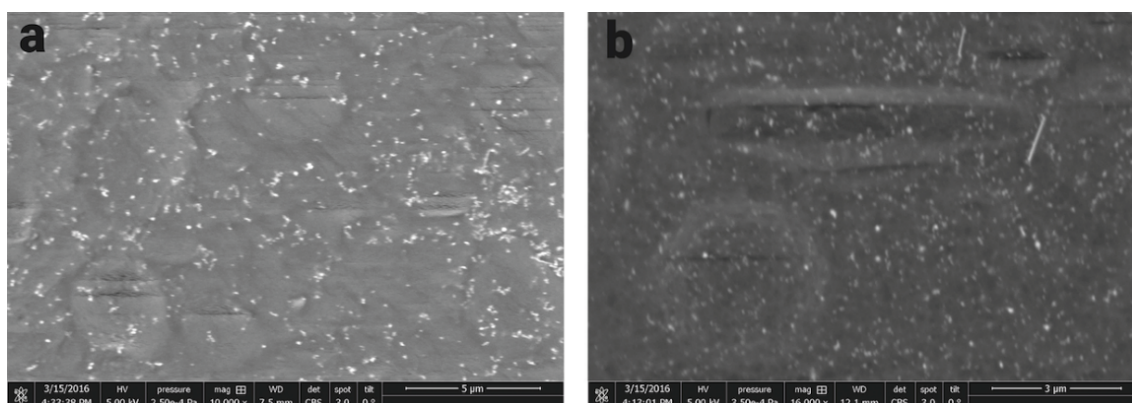


As AgNP 2 são ligeiramente menores que as AgNP 1, sendo menos polidispersas, como mostrado pelos dados de DLS e NTA, e menos estáveis eletrostaticamente, como mostrado pelo seu valor de potencial zeta (Tabela 3). A Figura 19 mostra o aspecto da suspensão de AgNP 2 e espectro no UV-Vis obtido, com o máximo da banda de ressonância de plasmon de superfície situado em 448 nm.



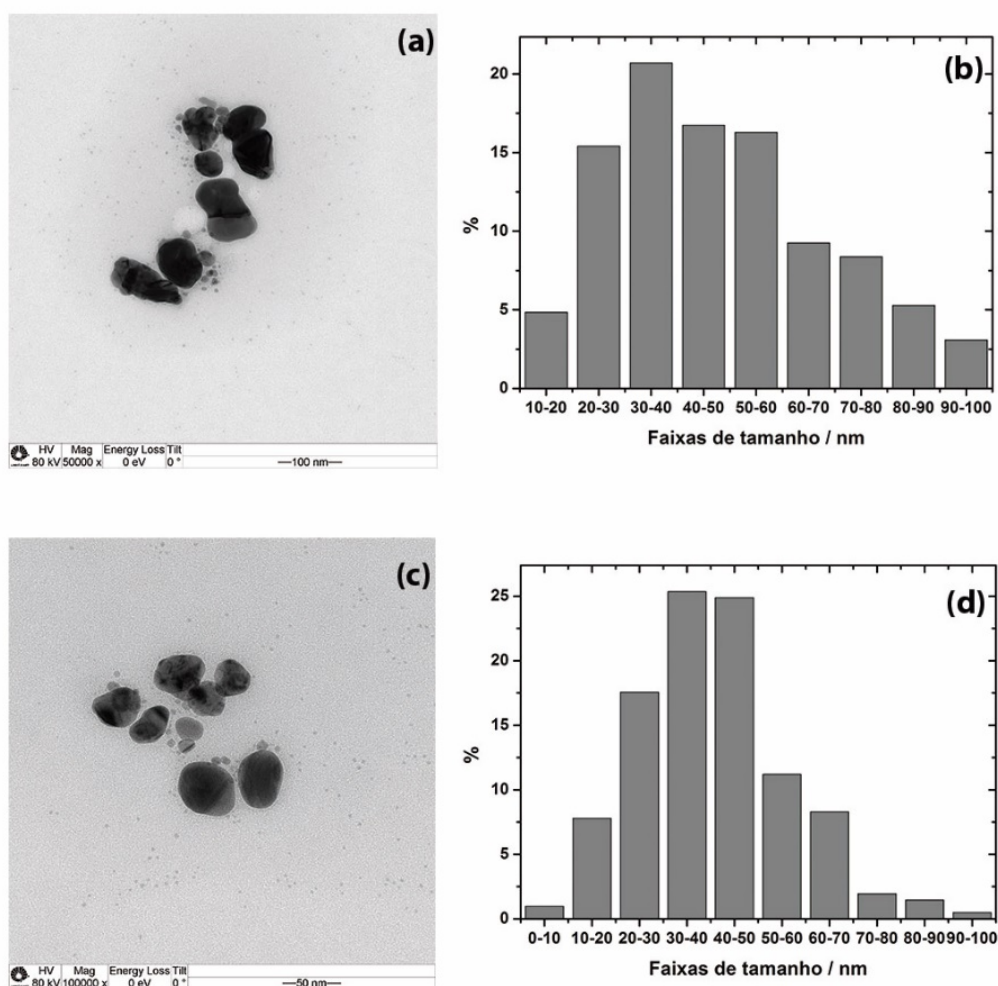
**Figura 19.** AgNP produzidas a partir de casca seca de laranja; (a) diferença de cor entre extrato (esquerda) e suspensão de AgNP; (b) espectro no UV-Vis mostrando banda de plasmon de ressonância em 448 nm.

Foi realizada análise por microscopia eletrônica de varredura das AgNP 1 e 2 (Figura 20). Analisando as imagens, é possível constatar a presença das nanopartículas como focos claros imersos em matéria orgânica, com pouca variação de tamanho.



**Figura 20.** Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura da (a) AgNP de extrato de casca fresca e (b) AgNP de extrato de casca seca.

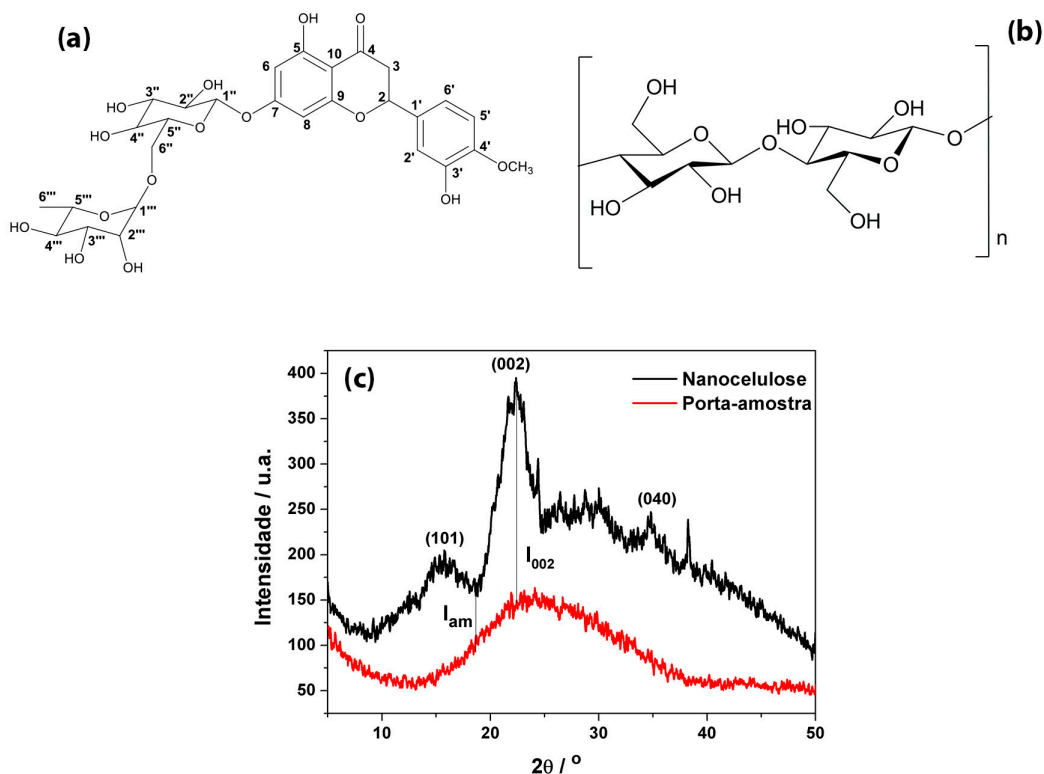
Por microscopia eletrônica de transmissão (Figura 21), nota-se que o diâmetro do núcleo metálico das nanopartículas é significativamente menor do que o diâmetro medido por espalhamento de luz: (a)  $48,1 \pm 20,5$  nm para AgNP de extrato de casca fresca e (b)  $40,7 \pm 16,2$  nm para AgNP de casca seca; denotando que as nanopartículas são envolvidas por material orgânico proveniente do extrato. O desvio padrão é ligeiramente alto, mostrando que o sistema não é completamente homogêneo, o que é de certa forma esperado visto que existem várias biomoléculas nos extratos que poderiam atuar como redutoras ou estabilizadoras; é uma reação com baixo controle, a despeito de ser simples, barata e sustentável. Os tipos de moléculas que podem atuar como agentes redutores são, muito provavelmente, de mais de uma classe, tendo em vista a rica matriz orgânica no extrato. Ácido ascórbico, ácido cítrico e flavonoides como a própria hesperidina, diosmina ou naringina são os candidatos mais prováveis.



**Figura 21.** Resultados de análises por microscopia eletrônica de transmissão, sendo (a) uma imagem adquirida de AgNP de extrato de casca fresca; (b) o histograma de faixas de tamanhos correspondente (contagem de nanopartículas = 227); (c) imagem adquirida de AgNP de extrato de casca seca e (d) histograma de faixas de tamanho correspondente (contagem de nanopartículas = 205).

A AgNP 3 foi sintetizada a partir da hesperidina, que age como um agente redutor, e conta com a estabilização provida pela nanocelulose. A hesperidina, sendo uma flavanona, possui conhecida capacidade antioxidante no corpo humano, refletida por seu moderado potencial de redução ( $E_{\text{red}} = 0,72 \text{ V}$ ). O par  $\text{Ag}^+/\text{Ag}$  possui potencial redutor ligeiramente maior ( $E_{\text{red}} = 0,799 \text{ V}$ ), o que é conveniente para uma reação redox que deve acontecer mais lentamente, com maior nucleação de prata metálica. Seu mecanismo de ação no corpo envolve uma reação radicalar na qual o

grupo fenólico do carbono 3' (Figura 22a) é oxidado para a correspondente cetona (Tasic et al. 2016).

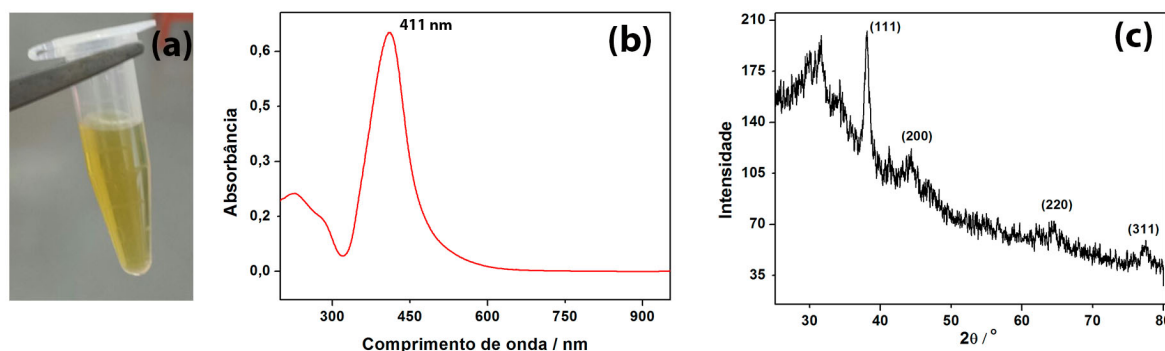


**Figura 22.** (a) Estrutura da hesperidina com carbonos numerados; (b) estrutura da nanocelulose e (c) difratograma de raios X da nanocelulose.

A nanocelulose, por outro lado, é um biopolímero presente em vegetais constituído por monômeros de glicose ligados por ligações  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) (Figura 22b) que possui cristalinidade pela presença de nanocristais ou nanofibras (Abitbol et al. 2016). A nanocelulose foi extraída com rendimento de 16% e seu grau de cristalinidade foi estimado pela utilização da técnica de difração de raios-X (Figura 22c), na qual as intensidades das difrações no plano (002) ( $I_{002}$  – situada em  $22,3^\circ$ ) e a intensidade do halo amorfo  $I_{am}$  fornecem uma boa estimativa deste parâmetro (Park et al. 2010). A Equação 6 mostra a fórmula utilizada para o cálculo do grau de cristalinidade, estimado em 75%.

$$GC (\%) = \frac{I_{002} - I_{am}}{I_{002}} \times 100\% \quad \text{Equação 6}$$

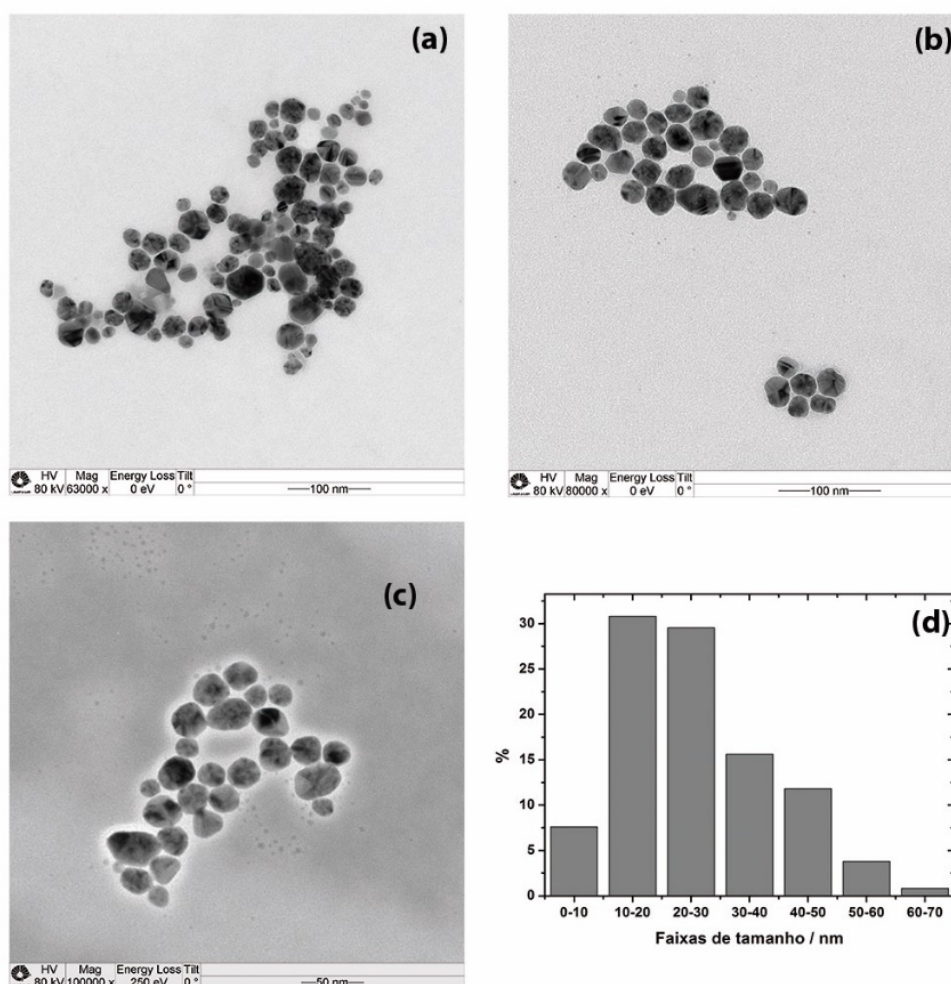
A presença da nanocelulose gera uma estabilização não só estérea como também eletrostática, tendo em vista o alto módulo de potencial zeta (Tabela 3). A Figura 23 apresenta foto da suspensão de AgNP, espectro no UV-Vis e difratograma obtidos.



**Figura 23.** (a) Aspecto da suspensão de AgNP produzida por solução alcalina de hesperidina e estabilizada com nanocelulose extraída de bagaço industrial de laranja; (b) espectro no UV-Vis correspondente, com a presença de banda de ressonância de plasmon em 411 nm e (c) difratograma de raios X típico de prata metálica (AgNP).

A banda de plasmon de ressonância apresenta-se mais deslocada para menores comprimentos de onda e com menor largura quando comparada às AgNPs feitas pelo extrato. Isto é reflexo do reduzido tamanho das nanopartículas, acompanhado por um maior confinamento quântico. Também efeito do reduzido tamanho, o difratograma de raios X tem menor razão sinal/ruído, porém ainda com os picos característicos de prata metálica em cela unitária cúbica de face centrada.

Foram também adquiridas imagens por microscopia eletrônica de transmissão para a AgNP 3, e novamente constatou-se que o núcleo metálico é notavelmente menor que o diâmetro hidrodinâmico obtido por espalhamento de luz ( $25,4 \pm 12,5$  nm em contraste com  $113,0 \pm 5,0$  nm). A Figura 24 mostra as imagens obtidas e gráfico de distribuição de tamanhos para as AgNP 3.

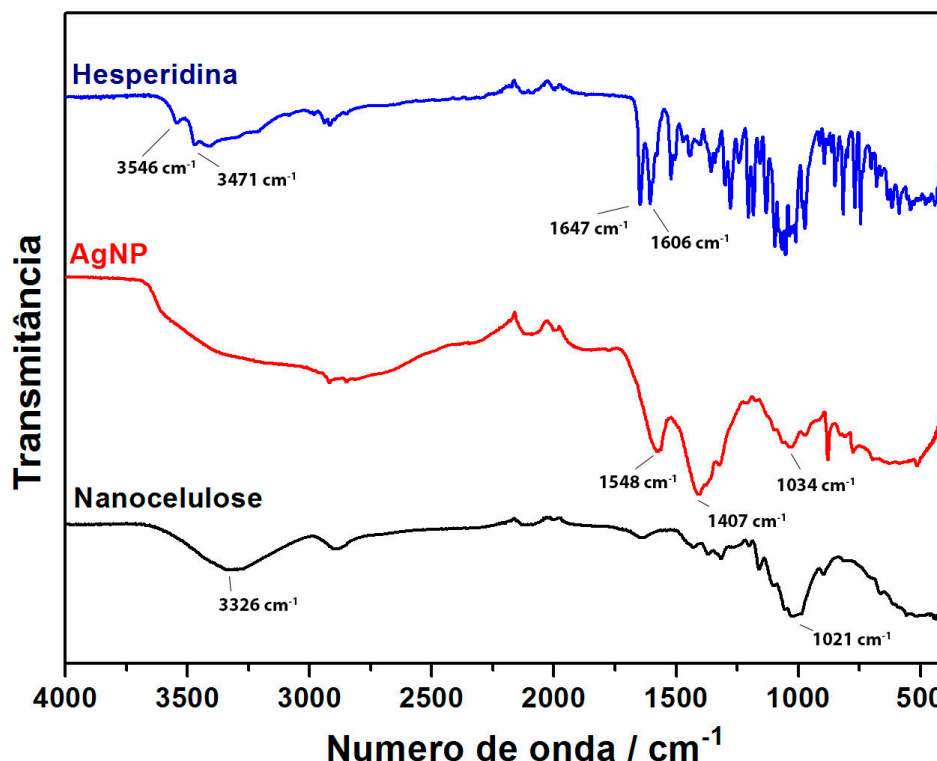


**Figura 24.** Análises de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) para AgNP 3, mostrando (a) e (b) sistema uniforme de nanopartículas; (c) imagem obtida por perda de energia de 25 eV, apresentando capa de material orgânico (nanocelulose) em branco ao redor das nanopartículas e (d) histograma de faixas de tamanhos das nanopartículas (contagem de nanopartículas = 237).

Para melhor elucidação das interações existentes entre hesperidina, nanocelulose e prata, foram obtidos espectros na região do infravermelho (Figura 25). Em geral, as bandas existentes no espectro correspondente à AgNP são alargadas, principalmente na região entre  $3500$  e  $3000\text{ cm}^{-1}$ , o que poderia ser explicado pela existência de água na amostra que não foi retirada pelo processo de liofilização. Percebe-se que a região de impressão digital (*fingerprint*,  $1500$ - $500\text{ cm}^{-1}$ ) da hesperidina é em parte ocultado pela presença das bandas pertencentes à nanocelulose no espectro da AgNP. A banda referente ao estiramento  $\text{C}=\text{O}$  em no espectro da hesperidina, que é desdobrada em duas ( $1647\text{ cm}^{-1}$  e  $1606\text{ cm}^{-1}$ ) devido à existência de uma ligação de hidrogênio intramolecular, é inexistente após a



formação das nanopartículas, que passa a apresentar uma banda razoavelmente alargada em  $1578\text{ cm}^{-1}$ . Além disso, a banda do espectro da nanocelulose em  $1021\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento C-O é deslocada para  $1034\text{ cm}^{-1}$  no espectro da AgNP, denotando que a estabilização provida por este biopolímero pode se dar através de suas hidroxilas.



**Figura 25.** Espectros de absorção na região do infravermelho para AgNP 3, nanocelulose e hesperidina.

## 4.2 Caracterização de interações entre biomoléculas e AgNP

Para os casos das AgNP 1 e 2, que utilizam extratos aquosos de casca de laranja para a biossíntese de AgNPs, foram utilizadas várias técnicas para chegar a um melhor entendimento das interações que ocorrem entre os núcleos metálicos e as biomoléculas presentes em solução.

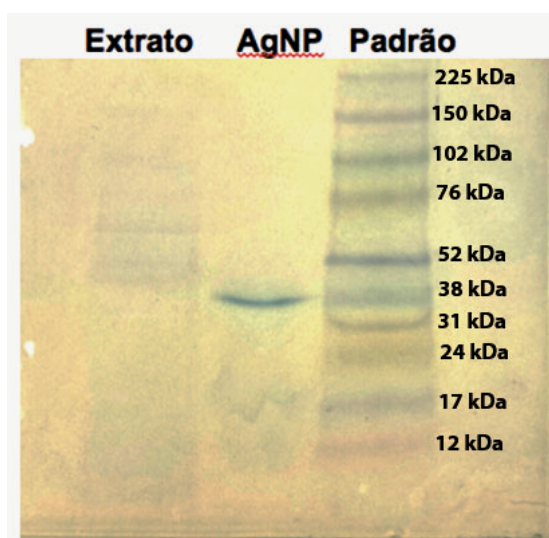
- Quantificação de proteínas pelo método de Bradford

A quantificação de proteínas foi efetuada pelo método de Bradford, cuja curva de calibração foi feita utilizando albumina de sêrum bovino (BSA). Foi determinado que a concentração de proteínas no extrato de casca fresca é de  $0,129\text{ mg g}^{-1}$  de casca fresca e a concentração na suspensão de AgNP correspondente é

de  $0,002 \text{ mg g}^{-1}$  de casca fresca. Logo, existe uma diminuição de aproximadamente 98% das proteínas em solução, o que sugere fortemente que as proteínas ficaram ligadas às nanopartículas precipitadas por ultracentrifugação durante a lavagem. De forma análoga para o extrato de casca seca, chegou-se a uma concentração de  $0,243 \text{ mg g}^{-1}$  de casca seca e  $0,017 \text{ mg g}^{-1}$  de casca seca na suspensão de AgNP correspondente, o que representa uma diminuição de aproximadamente 93%, também corroborando para o fato de que proteínas estão presentes na camada de estabilização das nanopartículas.

- Eletroforese (SDS-PAGE 15%)

A técnica de eletroforese foi utilizada para avaliar a massa molecular das proteínas presentes no extrato e na suspensão de nanopartículas correspondentes. A Figura 26 mostra uma foto do gel depois de corado com azul de *Coomassie*.



**Figura 26.** Análise das proteínas contidas no extrato de casca de laranja por eletroforese em gel SDS-PAGE (15%) mostrando a diferença entre padrões de mobilidade eletroforética das proteínas livres no extrato e complexadas com a prata na suspensão de AgNP (Padrão utilizado: Amersham Full-range Rainbow Molecular Weight Marker).

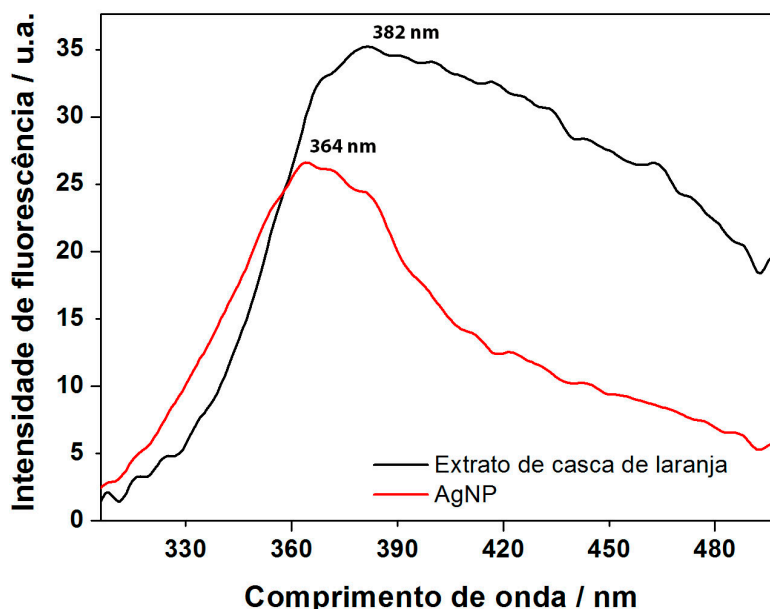
É possível constatar que a distribuição de massas moleculares das proteínas contidas no extrato difere significativamente com o padrão observado para a suspensão de AgNP correspondente. Uma banda intensa é vista em 38 kDa, além de bandas arrastadas na região entre 12 e 17 kDa. Considerando que as nanopartículas de prata não são pequenas o suficiente para serem arrastadas pelos



poros do gel, existe a probabilidade de que estas proteínas pertençam à uma segunda camada de proteínas que interage com as nanopartículas, a qual interage com uma primeira camada por meio de interações eletrostáticas e hidrofóbicas (interações proteína-proteína). A existência de mais de uma camada de corona de proteínas já foi comprovada e reportada na literatura (Rahman et al. 2013; Simberg et al. 2009).

- Emissão de fluorescência

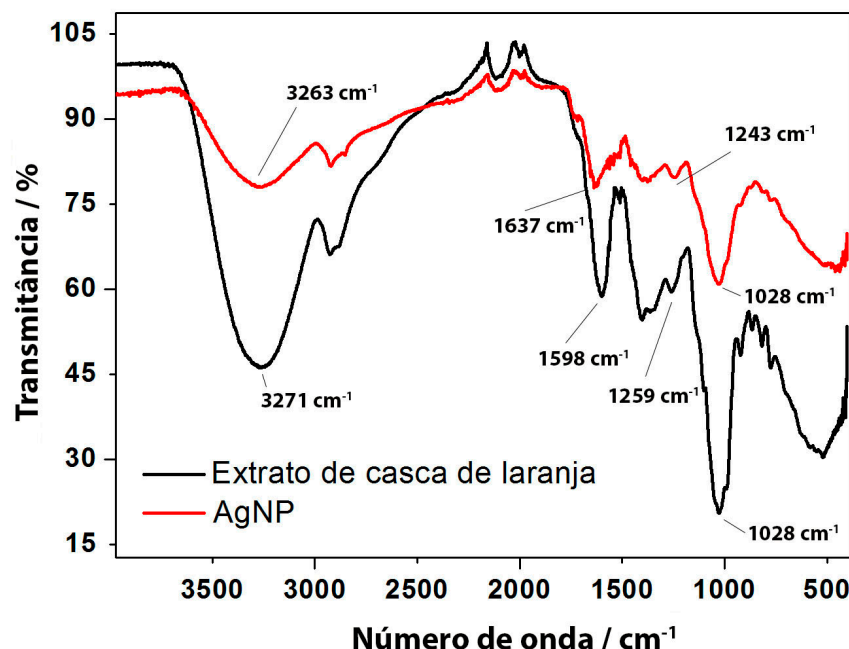
A emissão de fluorescência foi utilizada para o estudo de mudanças no padrão de emissão de compostos presentes no extrato após a formação de AgNP. No caso de proteínas, a fluorescência de resíduos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano) contidos em proteínas é bem estabelecida, sendo que geralmente apenas a fluorescência do triptofano é observada devido ao seu alto rendimento quântico. Considerando a hipótese de que proteínas presentes no extrato de casca de laranja são responsáveis pela estabilização das AgNP, mudanças no espectro de emissão seriam esperadas. De fato, como ilustrado na Figura 27, foi observado que ao excitar as amostras em 280 nm, o pico de emissão é deslocado em 18 nm, de 382 nm para 364 nm. Isto poderia sugerir que resíduos aromáticos responsáveis pela fluorescência passaram a interagir de forma distinta com o solvente (menos expostos ao solvente), o que seria uma evidência da sua interação com as nanopartículas de prata. No entanto, é preciso considerar que ao excitar a amostra neste comprimento de onda, outros compostos que contêm grupos aromáticos (como a própria hesperidina) também poderiam ser induzidos à emissão de fluorescência. Se estes compostos têm algum envolvimento na redução da prata e se associam às AgNP, o deslocamento do máximo de emissão poderia ser explicado como fruto da fluorescência de outras espécies (agora, oxidadas) em solução. A diminuição da intensidade de fluorescência (Lakowicz, 2006) poderia ser então resultado tanto de um consumo de pequenas moléculas fluoróforas da solução quanto de um efeito de supressão de fluorescência de proteínas devido à associação destas com as nanopartículas.



**Figura 27.** Espectros de emissão de fluorescência do extrato da casca de laranja fresca (diluído 2 vezes em água) e da suspensão de AgNP correspondente após excitação em 280 nm.

- Espectroscopia no infravermelho

Para estudar mais a fundo as interações entre biomoléculas e as AgNP, é preciso utilizar uma sonda que forneça informações dos grupos funcionais destas espécies que interagem diretamente com a superfície metálica. Neste contexto, a espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) fornece valiosas informações em deslocamentos de determinadas bandas. Na Figura 28 estão ilustrados os espectros na região do infravermelho do extrato de casca fresca e da suspensão de AgNP, ambos liofilizados, e evidenciando importantes diferenças nos deslocamentos de algumas bandas.



**Figura 28.** Espectros no infravermelho (FTIR) de amostras de extrato de casca fresca de laranja e AgNP correspondente.

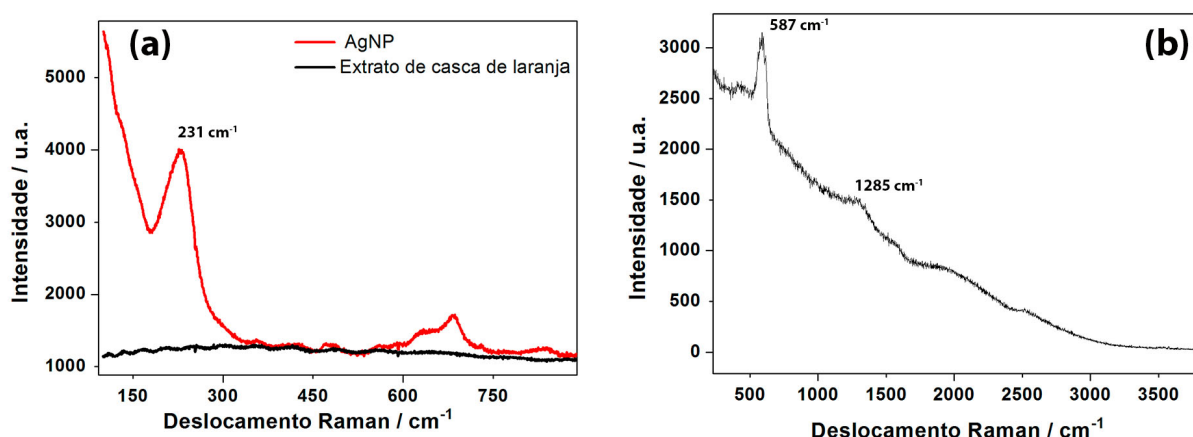
A banda presente em  $3271\text{ cm}^{-1}$  no espectro do extrato sofre um pequeno deslocamento para  $3263\text{ cm}^{-1}$  no espectro da AgNP. Esta região pode corresponder à uma soma das contribuições das bandas de estiramento N-H de proteínas e ácidos nucleicos e O-H de açúcares livres e polissacarídeos, no entanto, este leve deslocamento não é significativo tendo em vista a resolução do equipamento ( $4\text{ cm}^{-1}$ ). A intensa banda em  $1028\text{ cm}^{-1}$  sugere a presença de estiramento C-O, também corroborando para a presença de hidroxilas de açúcares. Já a banda de amida I, correspondente ao estiramento C=O, geralmente é situada em torno de  $1650\text{ cm}^{-1}$  e é altamente influenciada pela estrutura secundária de proteínas (Barth, 2007). Esta banda possui um “ombro”, e passa de  $1598\text{ cm}^{-1}$  para  $1637\text{ cm}^{-1}$ . Este aumento de número de onda pode ser relacionado a um aumento de força da ligação, já que supondo uma interação entre o nitrogênio de amidas e a prata, a estrutura de ressonância típica de amidas fica comprometida, fortalecendo a ligação C=O. Da mesma forma, a banda de amida III, que representa o acoplamento entre torção N-H com estiramento C-N, é altamente influenciada pelas estruturas secundárias de proteínas (Cai e Singh, 1999). Esta banda passa de  $1259\text{ cm}^{-1}$  no espectro do extrato para  $1243\text{ cm}^{-1}$  no espectro de AgNP.

As evidências apresentadas sugerem que há algum tipo de interação entre grupos  $\text{-NH-}$  de cadeias laterais ou da cadeia peptídica principal de proteínas

com a prata metálica das nanopartículas, bem como a interação de açúcares com seus grupos hidroxila com a prata.

- Espalhamento Raman

Amostras liofilizadas de AgNP1 e extrato correspondente foram submetidas à análise por espectroscopia Raman. Esta técnica é muito relevante uma vez que evidencia a existência de ligações e/ou interações que não são facilmente identificadas por espectroscopia no infravermelho. A Figura 29 mostra os espectros obtidos.



**Figura 29.** Espalhamento Raman como fonte de informações de importantes modos de vibração presentes, sendo que (a) é o espectro utilizando laser vermelho 632,8 nm para amostras liofilizadas de extrato de casca fresca e AgNP 1 e (b) é o espectro obtido para amostra liofilizada de AgNP 1 utilizando laser de 785 nm.

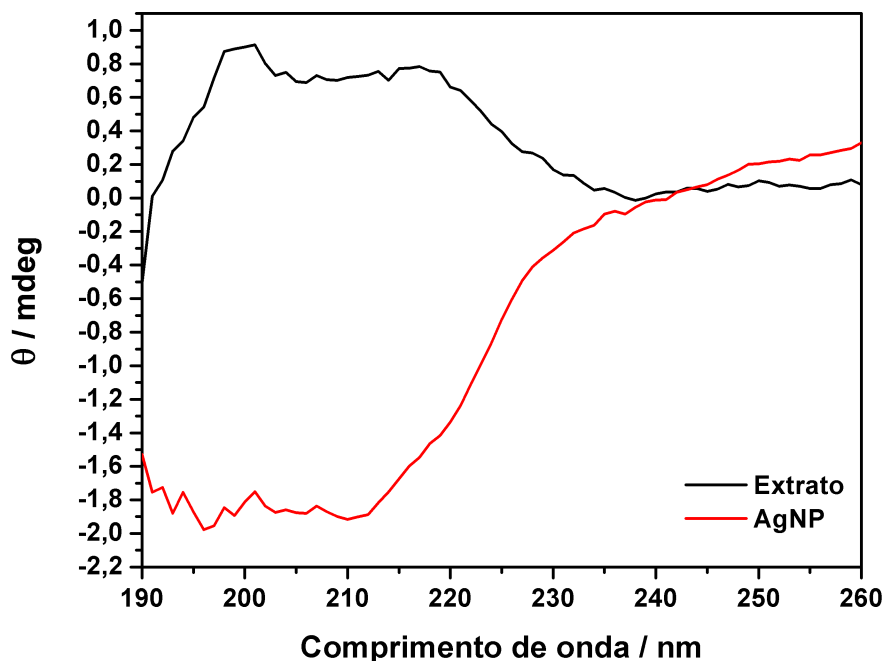
O espectro Raman da AgNP é de forma geral mais intenso que o correspondente do extrato, visto que a presença de um campo eletromagnético mais intenso na superfície das nanopartículas oriundo do plasmon de ressonância acarreta em um maior espalhamento Raman das moléculas que interagem diretamente com a superfície metálica (Stamplecoskie e Scaiano, 2011).

Na Figura 29a, a presença de uma banda intensa em  $231\text{ cm}^{-1}$  indica a existência da ligação Ag-S, o que sugere que resíduos de cisteína (-SH) das proteínas também são responsáveis pela estabilização das nanopartículas. A região com espalhamento moderado entre  $655\text{ cm}^{-1}$  e  $700\text{ cm}^{-1}$  contém a banda correspondente ao estiramento C-S (Dollish, 1974). Na Figura 29b, uma banda pouco intensa em  $1285\text{ cm}^{-1}$  é associada à banda de amida III, enquanto que a

banda mais estreita em  $587\text{ cm}^{-1}$  tem sua associação mais próxima ao modo de vibração de deformação de ligação S-S, que geralmente aparece em regiões mais baixas em energia, entre  $449\text{ cm}^{-1}$  e  $553\text{ cm}^{-1}$  (Rygula et al. 2013).

- Dicroísmo circular

A técnica de dicroísmo circular permitiu avaliar conteúdo de estruturas secundárias de proteínas através da passagem de luz circularmente polarizada pela amostra. Uma proteína com estrutura predominantemente de  $\alpha$ -hélice apresenta um espectro com dois mínimos em 222 e 208 nm e um máximo em 190 nm, ao passo que uma estrutura composta apenas por folhas- $\beta$  possui um espectro com um mínimo em 216-218 nm e um máximo em 198 nm. Já uma conformação randômica gera um espectro com um mínimo próximo de 200 nm (Corrêa e Ramos, 2009). No caso do extrato de casca de laranja, a obtenção do espectro é dificultada não apenas pela baixa concentração de proteínas em solução, mas também pela existência de uma matriz rica em variados compostos orgânicos, muitos deles quirais. Este último problema é parcialmente solucionado por um tratamento prévio com diálise. No caso da suspensão de AgNP, uma lavagem com ultracentrifugação seguida de suspensão é suficiente para eliminar interferentes e ter a garantia de se ter em suspensão possui apenas as proteínas que interagem com a superfície metálica. A Figura 30 mostra os espectros obtidos.



**Figura 30.** Espectros de dicroísmo circular de extrato de casca de laranja fresca e AgNP 1 correspondente.

Para proteínas isoladas e com concentrações conhecidas, seria possível a deconvolução dos espectros através de *softwares online* como K2D2 e K2D3 ou CDNN para então chegar às porcentagens estimadas de cada estrutura secundária. No entanto, este caso em particular apresenta não apenas uma mistura de proteínas de identidade desconhecida em baixa concentração, mas também uma provável presença de compostos orgânicos quirais que possam estar complexados com estas proteínas e também ácidos nucleicos, que são ativos nesta técnica devido às suas variadas conformações possíveis (Sprecher, Baase e Johnson Jr., 1979).

Desta forma, a única conclusão possível deste ensaio é a constatação de que compostos quirais (dentre eles, uma provável mistura de proteínas, ácidos nucleicos e pequenas moléculas) se arranjam de forma diferenciada ou com distintas estruturas secundárias em torno das nanopartículas ou simplesmente reagiram com íons prata, gerando espécies oxidadas que possuem diferentes espectros de dicroísmo circular.

- Espectrometria de massas

Após digestão das proteínas do extrato de casca fresca e das proteínas ligadas à AgNP correspondente, os peptídeos foram submetidos à análise UPLC-MS/MS. O servidor MASCOT foi utilizado para identificação de proteínas utilizando a base de dados CitrusSinensis2017. Valores de *score* acima de 32 indicam identidade ou homologia extensiva. O valor de *score* fornece uma estimativa da chance de acerto do alinhamento entre os peptídeos identificados pelo espectrômetro de massas e a proteína identificada pelo servidor. Tal valor depende do tamanho da base de dados, da existência de íons fragmentos para cada peptídeo identificado e da cobertura fornecida pelos peptídeos identificados em relação à proteína sugerida, dentre outros parâmetros. De forma geral, quanto maior o valor de *score*, menor a chance de que o alinhamento (e, conseqüentemente, a identificação de uma proteína) tenha sido feito de forma aleatória. Por este método, foram identificadas 6 proteínas provenientes do extrato e 3 proteínas ligadas à AgNP, conforme mostrado na Tabela 4.

**Tabela 4.** Proteínas identificadas por análise *Shotgun*, valores de *score*, ponto isoelétrico, massas nominais e cobertura.

PROTEÍNAS DO EXTRATO DA CASCA DA LARANJA						
Proteína identificada	Código NCBI*	Score	pl teórico	Massa (kDa)	Cobertura (%)	Sequência (peptídeos identificados em vermelho)
Predita: Proteína tipo germina subfamília 1 membro 17 [ <i>Citrus sinensis</i> ]	XP_006479011.1	69	5,33	24,247	12	MKAIQFLIGFALLALASSLASASDPSPLQD ICVAIEDPKDGVFVNGKFCKDPKLAR <b>AEDF</b> <b>FFSGLGKPGNTANRL</b> GVDETDANVEQIPGL NTLGISAFRIDYAPYGQRPPHIHPRASEIF LVLEGTLYVGFVTSQDLNNTLIAKVLNKG VVFVFPQGLIHFQFNIGKTNAAYALSNSQF PGEVTIADTVFGANPSINPDLGKAFQLDPK IVK <b>DLQNKFIN</b> GN
Proteína hipotética CISIN_1g0 14537mg [ <i>Citrus sinensis</i> ]	KDO42750.1	64	5,41	37,914	7	MATFLSCVFILFFLCFYVVSPIEAQTGGFS VELIHRDSPKSPFYNSSETPYQRLRDALTR SLNRLNHFNQNSSISSSK <b>ASQADIIPNNAN</b> <b>YLIRISIGTPPTER</b> LAVADTGSDLIWTQCE PCPPSQCYMQDSPLFDPKMSSTYKSLPCSS SQCASLNQKSCSGVNCQYSVSYGDGSFNG NLATETVTLTGSTTGQAVALPGITFGCGTNN GLFNSKTTGIVGLGGDISLISQMRTTIAGN QRLGVSTPDIVIDSDPTGSLELCYSFNSLSQ VPEVTIHFGRADVKLRSRNFVVKVSEDIVCS VFKGITNSVPIYGNIMQTNFLVGYDIEQQT V SFKPTDCTKQ
Proteína hipotética	KDO81314.1	29	5,85	48,886	2	VFVNDQFLNWDPEHRIKVRIVSARAYHSLF MHNMCIRPTSEELEDFGTPDFTIYNAGQFP

CISIN_1g0 058651mg, parcial [ <i>Citrus sinensis</i> ]							CNRYTHYMTSSTSIDINLARKEMVILGTQY AGEMKKGLFSLMHYLMPCRQILSLHSGCNM GKDGDVALFFGLSGTGKTTLSTDHNRYLIG DDEHCWSDNGVSNIEGGCYAKCIDLSREKE PDIWNAIKFGTVLENIVFDEHTREVDYLDK SVTENTRAAYPIEYIPNAKIPCVGPHPKNI ILLACDAFGVLPVSKLSLEQTMHYHFISGY TALVAGTEEGVKEPRATFSACFGAAFIMLH PTKYAAMLAEKMOKHGATGWLVTGWSSGGS YGSNGRIKLAFTTRRIIDAIHCGTLLEASYTK TPVFGLEIPTEIEGVPSEILDPENTWSDMKA YKDTLLKLGLTFKKNFEGFVNHHKIGEDNKLT DEILAAGPLF
Predita: Alergênico tipo Pru ar 1	XP_006489010. 1	29	5,97	19,362	6		MIITMDENTKRVTQSFVTQVSPSRMFKALI LDShNICPRLLFSSIKSIEYFEGDGDVGTI KQINYLEGGEIRYTKHRVDALDKEKFCVKY RFIEGDGFIDSMLEFLTHEIKFEGYGQGGC VCKITCDFKAKEGVEIKGIDIELVKHKPLG MYEVVEAHLKAYPQLYA
Predita: Fator de elongação 1-alfa [ <i>Citrus sinensis</i> ]	XP_006485903. 1	28	9,19	49,686	2		MGKEKFHINIVVIGHVDSGKSTTTGHLIYK LGGIDKRVIERFEKEAAEMNKRSFKYAWVLD KLKAERERGITIDIALWKFETTKYICTVIDA PGHRDFIKNMITGTSQADCAVLIIDSTTGGF EAGISKDGQTREHALLAFTLGVKQMCCCCNK MDATTPKYSKARYDEIVKEVSSYLKKVGYNP DKIPFVPISGFEGDNMIERSTNLDWYKGPTL LEALDQINEPKRPTDKPLRLPLQDVYKIGGI GTVPVGRVETGVLPKGMVVTFGPSGLTTEVK SVEMHHESLQEALPGDNVGFNVKNVSVKDLK RGYVASNSKDDPAKGASNFTSQVIIMNHGQ IGNGYAPVLDCHTSHIAVKFAEILTKIDRRS GKELEKEPKFLKNGDAGFVKMIPTKPMVET FSEYPPLGRFAVRDMRQTVAVGVIKSVDKKD PSGAKVTKSAVKKK
Predita: Proteína 4 de resistência à doença tipo RPP13 [ <i>Citrus sinensis</i> ]	XP_006487739. 1	18	7,69	99,001	2		MAASKATEAMIGTLIEKVFSALLTQAQYAL DFKDQLAAMKTKLELMTAFISCTDKQKTRGE FMQKILPNLRKIIYEADDIMTDCQIRDEYRK DGFCHRFSLRDLFFIYQTGKDLKHINSRIEK MESSLGVYGRAEQPIIQQGPNNSSYQIFKYS PEDREPSEIIGLEKDLEKIKGWILSSNEKLQ QIGIVGMGGLGKTTIAQKIFNDGEMVAYFEK RIWVPVSQNFCEERVMRAMLKQLGEDESIE ESYLLHKIQQRLSDKTCLIVMDDVWRMNLDW WKNLYPTEKRCFVIITSRNETVVNSMGVDES RIHRPKILNEEESWSLPCKHAFLLTSKGKCPN KEFEKKGREILKKCGGLPLAIKTIGGLLAPK VHSLSEWNKINDDFHVYLTERENNSVVASL RLSYDELPTHKQCLLCFSVYPDDFEISGEQ MVHWWVGEGLIRGRDNWTATELGFDYLSLV SRCLVEVVHRRGYDGRVYSCKMHDLVDRMTI QIAKDEAFCSFDEQGRQKLTQDSRWFGFTSD MDPKSLKKSSRLRALILTSSTAVSFWNVKS MSLRVLDVSYCKLDRMNVEDLLDKISSLR ACLNLSGVAGNIELPSSIQKLRNLQILVLR



CTKLHPSITSLKKLI ILDLGSCPLQYLPHGL  
 EKLIYLOELSGFRVASQSNTQGCRNLALLGL  
 KQLRVL RMSINNESEISEDEWNVLSQLEKLG  
 VLAI DAEDCKEKHVSQMLDRLLPPPSLQELY  
 LRRYRHEILPKWINLKHLSLQYLCLEDGDI  
 SNFEISSESDQDSNGTTWVLEGLCLKFMPNL  
 ILDWNVLLKDMPI LRYAEVSRCFNLKNFPYP  
 SDKPAVWKKNQD

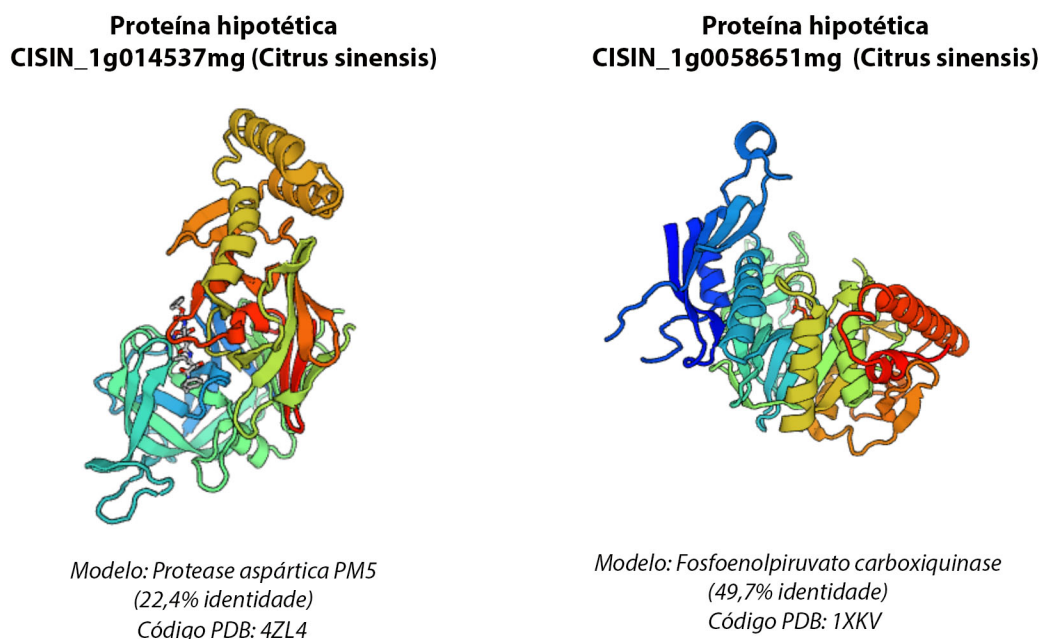
### PROTEÍNAS LIGADAS À AgNP

Predita: Proteína tipo germina subfamília 1 membro 17 [ <i>Citrus sinensis</i> ]	XP_00647 9011.1	80	5,33	24,247	8	MKAIQFLIGFALLALASSLASADPSPLQDICVA IEDPKDGVFVNGKFCKDPKLAR <b>AEDFFFSGLGKP</b> <b>GNTANRL</b> GVDETDANVEQIPGLNTLGISAFRIDY APYGQRPPHIHPRASEIFLVLEGTLYGVFVTSQDQ LNNTLIAKVLNKGDFVFPQGLIHFQFNIGKTNA AAYSALNSQFPGEVTIADTVFGANPSINPDLGK AFQLDPKIVKDLQNKFINGN
Proteína hipotética CISIN_1g0 14537mg [ <i>Citrus sinensis</i> ]	KDO42750 .1	28	5,41	37,914	7	MATFLSCVFILFFLCFYVVSPIEAQTGGFSVELI HRDSPKSPFYNSSETPYQRLDALTRSLNRLNHF NQNSSISSSS <b>ASQADI</b> IPNNANYLIRISIGTPPT <b>ER</b> LAVADTGSDLIWTQCEPCPPSQCYSMDSPFLD PKMSSTYKSLPCSSSQCASLNQKSCSGVNCQYSV SYGDGSFSNGNLATETVTLGSTTGQAVALPGITF GCGTNNGGLFNSKTTGIVGLGGDISLISQMRIT IAGNQRLGVSTPDIVIDSDPTGSLELCYSFNSLS QVPEVTIHFRGADVKLRSNFFVKVSEDIVCSVF KGITNSVPIYGNIMQTNFLVGYDIEQQTVSFKPT DCTKQ
Predita: Proteína homóloga IN2-1 tipo B [ <i>Citrus sinensis</i> ]	XP_00647 1422.1	27	8,98	10,323	13	MATTAQENLPPPLDSK <b>AELPPLFDGTPR</b> LYISYS CPFAQRAWITRNYKGLQDKIKLVPLNLQDRPAWY KEKVYPVNKVMLMLMLMCDQ

O fato de que, das 3 proteínas identificadas como aderidas à AgNP, apenas 2 também foram identificadas no extrato, pode indicar que a associação de proteínas à superfície das nanopartículas pode aumentar a concentração local proteica, facilitando assim a detecção das mesmas na análise MS/MS.

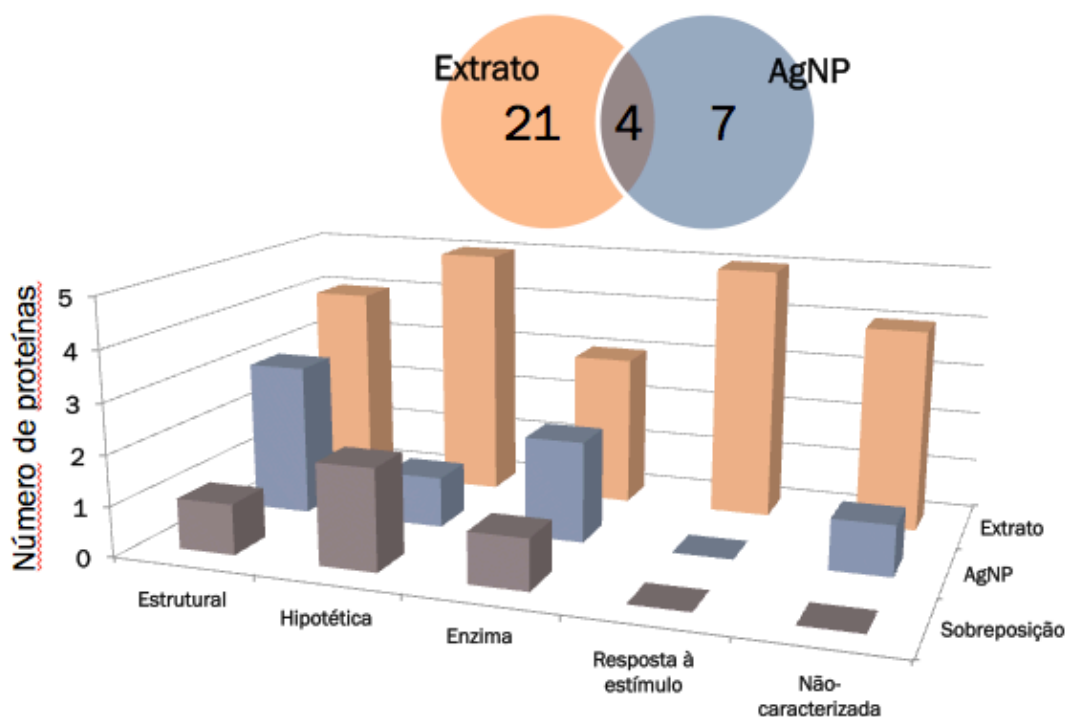
É interessante notar a presença de algumas proteínas hipotéticas (Figura 31) tanto no extrato quanto na amostra de nanopartículas. Proteínas hipotéticas são aquelas que foram sugeridas apenas com base no genoma do organismo por ferramentas de bioinformática e que, portanto, até então não haviam sido detectadas

experimentalmente ou mesmo preditas quanto à sua homologia. A proteína hipotética CISIN\_1g014537 teve sua sequência analisada utilizando a ferramenta SWISS-MODEL para encontrar modelos (*templates*) de maior homologia. Neste caso, a proteína protease aspártica PM5 possui 22,4% de identidade com a sequência de aminoácidos da proteína hipotética. Por outro lado, proteína hipotética CISIN\_1g0058651 possui 49,7% de identidade com fosfoenolpiruvato carboxiquinase, que é uma enzima conhecida por participar do processo de gluconeogênese em organismos eucariontes. Tal enzima catalisa a conversão de oxaloacetato em fosfoenolpiruvato e dióxido de carbono (Yang, Kalhan e Hanson, 2009).



**Figura 31.** Representação de modelos tridimensionais em *cartoon* de proteínas hipotéticas identificadas por análise *Shotgun* no extrato de casca fresca de laranja utilizando o programa SWISS-MODEL.

Além das proteínas identificadas na Tabela 4, também foram feitos alinhamentos entre peptídeos e proteínas utilizando a ferramenta BLAST. Foram utilizados fragmentos com *ion score* maior que 10, e as proteínas identificadas por este método estão relacionadas no Apêndice 5. No total, foram identificadas 32 proteínas de *Citrus sinensis*, e as mesmas foram classificadas quanto à sua procedência e tipo, conforme mostrado na Figura 32.



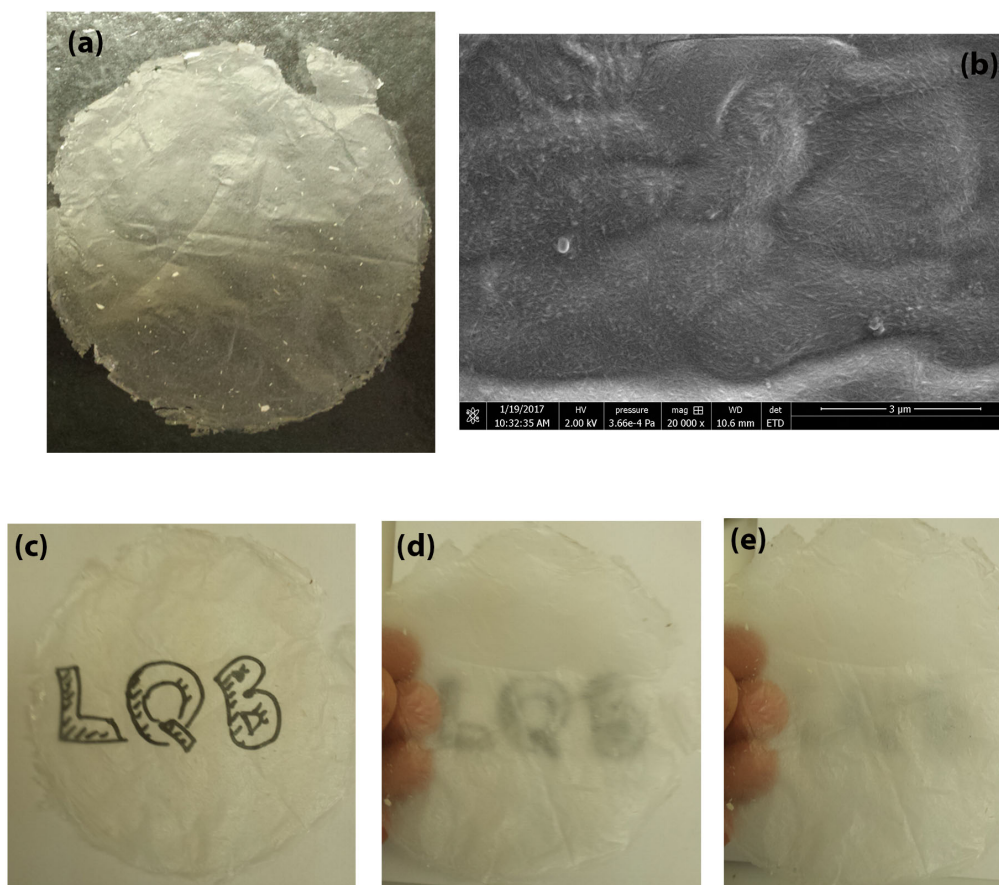
**Figura 32.** Classificação de proteínas identificadas por experimento de UPLC-MS/MS. A separação foi feita com base em proteínas encontradas no exclusivamente no extrato (laranja), proteínas encontradas exclusivamente na superfície de AgNP (cinza claro) e encontradas em ambos os grupos (cinza escuro).

A técnica de espectrometria de massas foi empregada com sucesso para confirmar a presença de proteínas no extrato da casca de laranja e possibilitou a identificação de proteínas envolvidas na estabilização das AgNP. É interessante notar que todas as proteínas tidas como aderidas às AgNP possuem resíduos de cisteína e resíduos que contêm grupos amino na cadeia lateral, o que corrobora com a observação de que átomos de enxofre e nitrogênio podem interagir covalentemente com a superfície metálica da prata, obtida pelas técnicas espectroscópicas já discutidas.

#### 4.3 Produção e caracterização de filmes de nanocelulose contendo nanopartículas de prata

A utilização de celulose na forma de nanocristais ou nanofibras para a manufatura de filmes ou papéis vem sendo reportada como uma das grandes

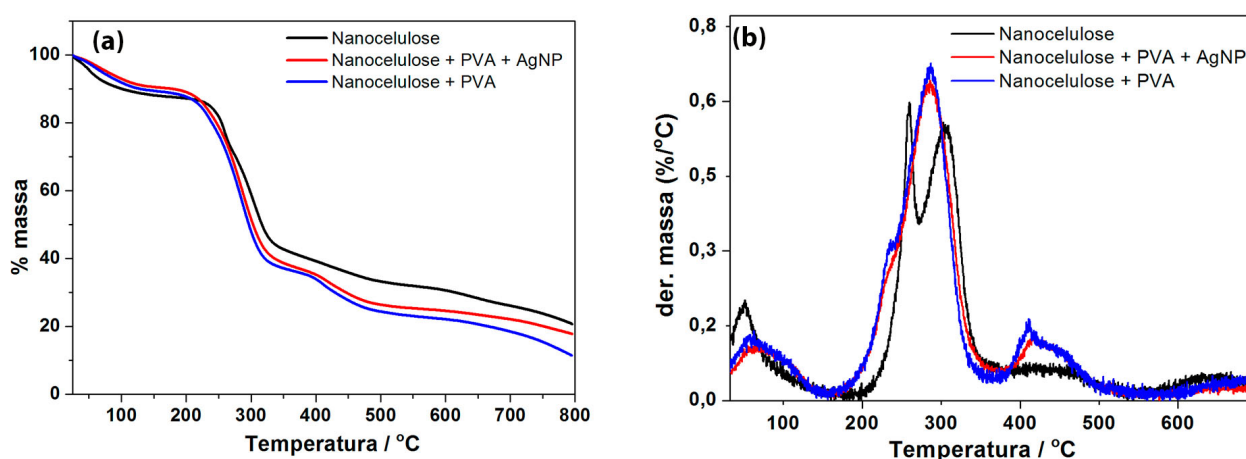
aplicações deste nanomaterial (Kim et al. 2015; Zhang, Jung e Zhao, 2017). No caso de nanocelulose extraída do bagaço industrial da laranja, foi observado que o filme produzido, por mais que transparente, liso e razoavelmente maleável, poderia ter suas características mecânicas melhoradas pela adição de um outro polímero. Neste sentido, foi escolhido o álcool polivinílico (PVA) por sua alta biodegradabilidade e presença de grupos hidroxila em sua estrutura que podem interagir com os grupos hidroxila da celulose por meio de ligações de hidrogênio (Lee et al. 2009). De fato, a adição de PVA na proporção de 1:1 (m:m) na suspensão de nanocelulose resulta em um filme mais resistente, mais dobrável e maleável. Considerando as atuais aplicações de filmes de nanocelulose na indústria de embalagem de alimentos (Azeredo, Rosa e Mattoso, 2017), pretendeu-se a impregnação destes filmes biodegradáveis com nanopartículas de prata (AgNP 3) para conferir propriedades antibacterianas e antifúngicas ao material (Figura 33a). Por microscopia eletrônica de varredura (Figura 33b), constatou-se a presença de uma rede de nanofibras de celulose dispersas em uma matriz amorfa. A superfície apresenta algumas rugosidades, o que é esperado tendo em vista que o processo de secagem ainda não possui uma forma rigorosa de manutenção de uma superfície plana. Devido à resolução do equipamento, não é possível visualizar as nanopartículas de prata no material. Uma diferença fundamental entre o papel de nanocelulose e o papel de celulose comum é a diminuição do diâmetro das fibras de celulose da escala micrométrica para a escala nanométrica. Como resultado, a luz deixa de ser completamente espalhada para trás (*back-scattering*) e passa a ser parcialmente transmitida pelas fibras e espalhada para frente (*forward scattering*) (Hu et al. 2013). Isto faz com que, à curtas distâncias, o filme seja completamente transparente, ao passo que quando colocado a alguns centímetros de distância do objeto, ele espalha a luz transmitida (Figuras 33c-e).



**Figura 33.** (a) Aparência de filme de nanocelulose extraída de bagaço industrial de laranja; (b) microscopia de varredura do filme mostra rugosidades e presença de nanofibras de nanocelulose e (c), (d) e (e) mostram propriedades ópticas do filme em contato com um objeto, a 0 cm, 2 cm e 5 cm de distância do objeto, respectivamente.

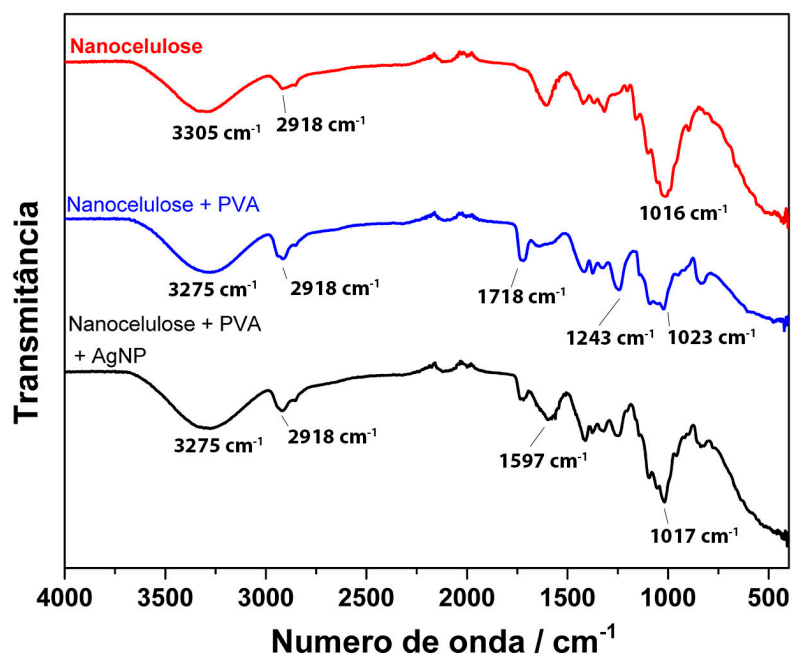
Para uma maior elucidação da composição dos filmes, foram feitas análises termogravimétricas em atmosfera de  $N_2$  em rampa de aquecimento até 800,0 °C. O filme de nanocelulose puro (linha preta, Figura 34) apresenta um primeiro evento térmico em 52 °C (com uma perda de massa de aproximadamente 15%) que pode ser interpretado como perda de água da estrutura polimérica. Dois eventos térmicos principais são observados, um em 260 °C e outro em 308 °C, deixando o material com 44% de sua massa original. Tipicamente, a presença destes dois eventos refere-se à presença de hemicelulose e celulose não-cristalina (que tem suas ligações glicosídicas degradadas em menores temperaturas) e de celulose cristalina, que é degradada apenas em maiores temperaturas (Cinnamea, Stefani e Ruseckaite, 2010). A presença de um pico alargado entre 400-500 °C

poderia ser explicada pela degradação de lignina remanescente no material (Ludueña, et al. 2011). A adição de PVA no material induziu uma mudança no padrão de eventos térmicos, de forma que agora apenas um evento térmico principal centrado em 287 °C é observado. Este resultado está em concordância com o encontrado na literatura para o PVA puro (Kim et al. 2002), o que pode sugerir que há uma sobreposição de eventos térmicos do PVA e da nanocelulose. A adição de nanopartículas de prata não modificou o padrão de degradação térmica do material de forma significativa.



**Figura 34.** (a) Análise termogravimétrica de filmes de nanocelulose extraídos de bagaço de laranja utilizando atmosfera de nitrogênio e (b) derivada da análise termogravimétrica, destacando os eventos térmicos que ocorrem com o aumento gradual de temperatura.

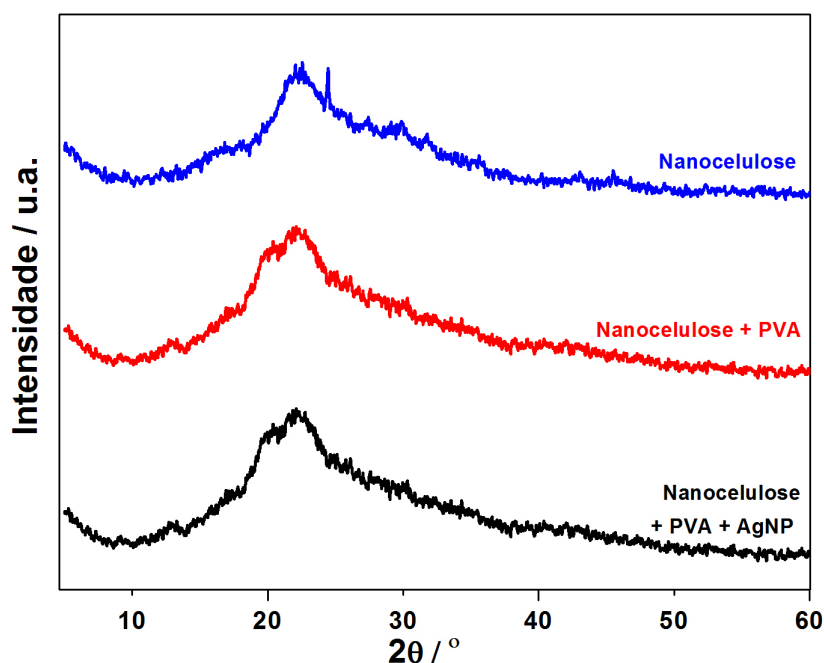
Por espectroscopia na região do infravermelho (Figura 35) foram observadas bandas típicas de nanocelulose na região de 3600 a 3100  $\text{cm}^{-1}$  correspondentes ao estiramento O-H e em 2918  $\text{cm}^{-1}$  correspondente à vibrações da cadeia alifática (C-H) (Li et al. 2012). A banda centrada em 1016  $\text{cm}^{-1}$ , por sua vez, relaciona-se com o estiramento C-O. A adição de PVA no filme resultou no aparecimento de uma nova banda em 1718  $\text{cm}^{-1}$ , que é típica de PVA não hidrolisado e uma banda em 1243  $\text{cm}^{-1}$  (Blout e Karplus, 1948). A presença de nanopartículas de prata no filme não induziu mudanças significativas no espectro, como era esperado, com exceção da intensificação de uma banda centrada em 1597  $\text{cm}^{-1}$ .



**Figura 35.** Comparação entre espectros na região do infravermelho de filmes de nanocelulose produzidos.

Uma investigação da estrutura cristalina dos filmes também foi realizada por meio da técnica de difração de raios-X (Figura 36). Em contraste com a mesma análise realizada com a amostra em forma de pó (como apresentado na Figura 21), não são visualizados os picos em (101) e (040) relativos à fase cristalina da celulose. Além disso, o pico mais intenso correspondente à reflexão dos planos da família (002) em  $2\theta = 22,3^\circ$  é alargado. A adição de PVA na mesma proporção da nanocelulose no filme resulta no aparecimento de um pico da fase cristalina do polímero em  $2\theta = 20,0^\circ$ , que é sobreposto com a reflexão (002) da nanocelulose. Tal reflexão, por sua vez, é relativa à reflexão das famílias de planos (10 $\bar{1}$ ) e (101), que são sobrepostos (Ricciardi et al. 2004). A adição de AgNP não produziu mudanças significativas no padrão de difração do material e os picos relativos às reflexões da cela unitária da prata elementar não são observados, o que já era esperado tendo em vista a baixa concentração de prata utilizada e a alta dispersão das nanopartículas na matriz de nanocelulose/PVA.





**Figura 36.** Comparação de difratogramas de raios-X dos filmes de nanocelulose produzidos.

#### 4.4 Síntese biogênica de nanopartículas de cloreto de prata (AgCl NP) utilizando extrato bacteriano

A produção de nanopartículas de cloreto de prata é comumente observada no caso de sínteses por rotas biológicas utilizando bactérias (Paulkumar et al. 2013) e, principalmente, fungos (Picoli et al. 2016; Chandrappa et al. 2016; Eugenio et al. 2016). Neste caso, este padrão também foi observado pelo fato de que, muito provavelmente, as biomoléculas produzidas pela *Xanthomonas* não possuem potencial redutor suficiente para reduzir os íons prata em solução. O que ocorre é a formação de nanocristais de cloreto de prata que são estabilizados por estas biomoléculas. No caso de síntese biológica com extratos de plantas, como mostrado nas seções anteriores, muitos metabólitos secundários e outros compostos relacionados à defesa da planta podem ser extraídos, sendo estes compostos agentes redutores da prata.

Pelo fato de que as nanopartículas aqui produzidas não são completamente metálicas, o fenômeno de ressonância de plasmon de superfície não é observado, o que dificulta o acompanhamento da reação de formação de AgCl NP (algo facilmente realizado para AgNP pela absorção na região do UV-Vis, previamente comentado). Portanto, o aspecto da suspensão é límpido e



transparente, sendo que a existência de um sistema coloidal só é notado após ultracentrifugação das amostras, que leva à precipitação das nanopartículas. Sendo um sal de prata, o cloreto de prata na forma de nanocristais é extremamente sensível à luz, sendo convertido facilmente em  $\text{Ag}^0$  à menor exposição de luz ambiente, o que é notado pelo aparecimento da cor amarelo-alaranjada característica de nanopartículas de prata metálica.

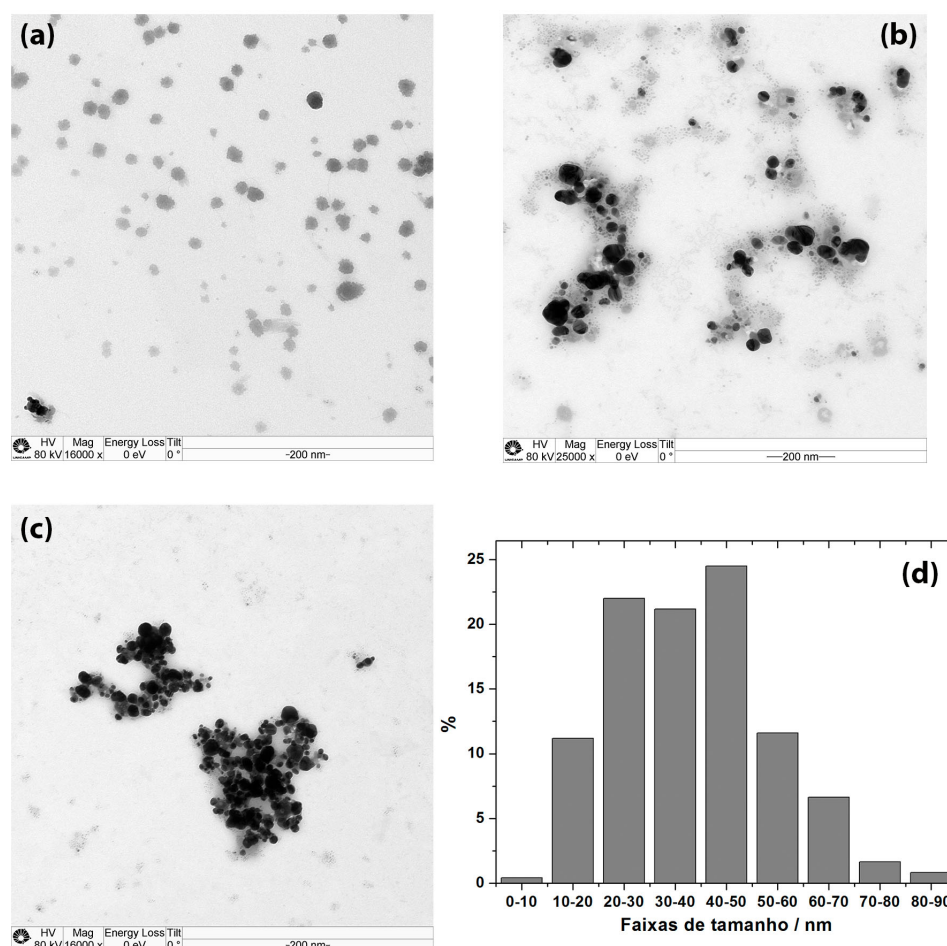
Um aspecto que se destaca neste tipo de nanopartícula é o alto valor do módulo de potencial zeta (Tabela 5), o que de fato é observado na prática com a alta estabilidade desta suspensão, sendo estável por mais de seis meses em local protegido da luz.

**Tabela 5.** Dados de nanopartículas de cloreto de prata feitas a partir de extrato bacteriano

Tipo	Diâmetro médio / nm (DLS)	Polidispersidade (DLS)	Diâmetro médio / nm (TEM)	Potencial zeta / mV
AgCl NP	133,5 ± 18,8	0,332	38,7 ± 15,6	-30,0 ± 1,0

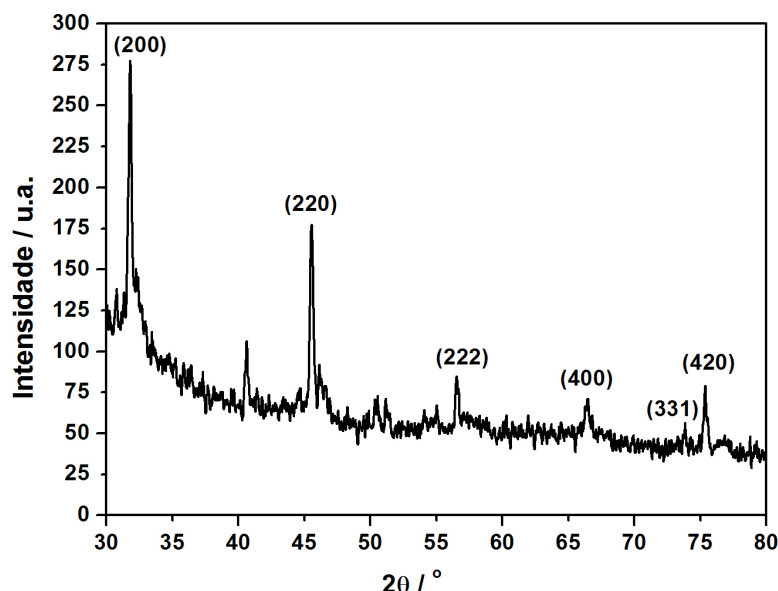
\*O relatório de distribuição de tamanho por DLS e potencial zeta são apresentados no Apêndice 2.

A Figura 37 mostra microscopias de transmissão da suspensão de nanopartículas, que possui um tamanho médio de  $38,7 \pm 15,6$  nm, que contrasta com o tamanho de  $133,5 \pm 18,8$  nm obtido pela técnica de DLS. É observado que em determinadas regiões da amostra as nanopartículas aparecem isoladas e bem dispersas (Figura 37a), ao passo que outras regiões apresentam nanopartículas aglomeradas fisicamente pela presença de uma matéria orgânica notada por manchas acinzentadas (Figuras 37b e 37c). Esta matéria orgânica pode ser composta tanto de proteínas da bactéria quanto por goma xantana, que é a substância polimérica extracelular produzida por bactérias do gênero *Xanthomonas* (Rigano et al. 2007). Este polissacarídeo é secretado no processo de formação de biofilme da *Xanthomonas* e pode ser também produzido em culturas líquidas da bactéria (Palaniraj e Jayaraman, 2011).



**Figura 37.** Microscopias eletrônicas de transmissão de nanopartículas de cloreto de prata produzidas por extrato bacteriano de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (a), (b) e (c) e histograma de faixas de tamanho das nanopartículas (d) (contagem de nanopartículas = 241).

A forma mais adequada de constatar a presença de nanopartículas de cloreto de prata em uma suspensão consiste da obtenção de um difratograma de raios X da amostra liofilizada. A Figura 38 mostra o padrão de difração obtido, com destaque aos picos em  $31,8^\circ$ ,  $45,6^\circ$ ,  $56,5^\circ$ ,  $66,5^\circ$ ,  $73,8^\circ$  e  $75,4^\circ$ , que correspondem às famílias de planos (200), (220), (222), (400), (331) e (420), respectivamente. Tal padrão de difração confirma a presença de cristais de cloreto de prata em seu arranjo cúbico de face centrada (Durán, Nakazato e Seabra, 2016).

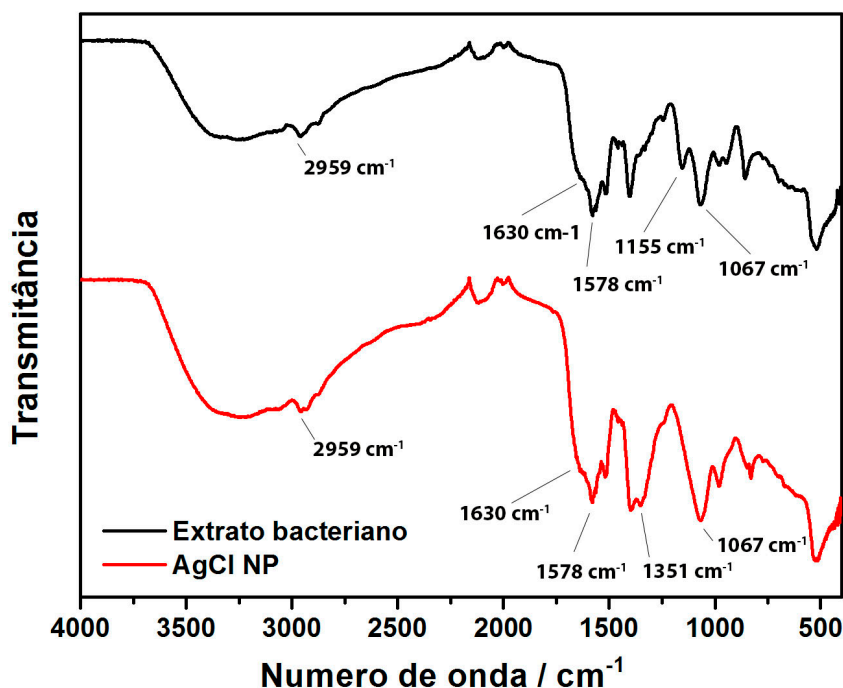


**Figura 38.** Difratoograma de raios-X de amostra liofilizada de nanopartículas de cloreto de prata.

Trabalhos anteriores do grupo, cujos resultados ainda não foram publicados, reportaram a existência de proteínas secretadas pela *Xac* que podem vir a ser relacionadas com a sua patogenicidade. Desta forma, foi pressuposto que parte das biomoléculas que estabilizam as AgCl NP poderiam ser proteínas. Desta forma, foi feita uma quantificação de proteínas pelo método de Bradford na suspensão original de nanopartículas e no sobrenadante da suspensão após ultracentrifugação. A concentração de proteínas encontrada na primeira foi de  $4,3 \pm 0,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ , ao passo que a concentração do último foi de  $1,6 \pm 0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Isto confirma que em torno de 63% das proteínas do extrato foram, de alguma forma, ligadas às AgCl NP.

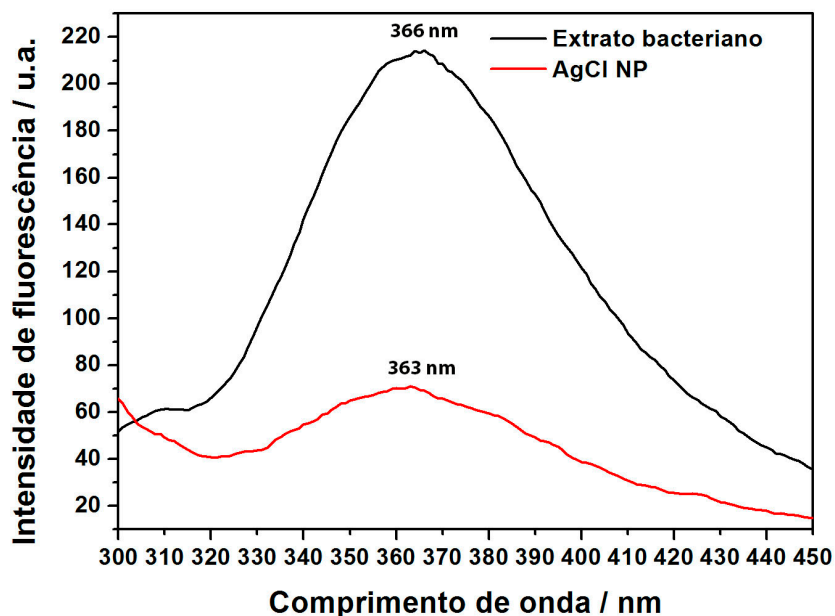
Os espectros na região do infravermelho do extrato bacteriano e da AgCl NP (Figura 39) apresentam bandas características de alguns grupos de biomoléculas. A banda alargada na região entre  $3500$  e  $3100 \text{ cm}^{-1}$  pode conter modos de vibração tanto de estiramento simétrico de N-H de aminas de proteínas quanto de estiramento simétrico de O-H de hidroxilas de polissacarídeos. A banda pouco intensa em  $2959 \text{ cm}^{-1}$  corresponde ao estiramento C-H, ao passo que a banda em aproximadamente  $1630 \text{ cm}^{-1}$  que é sobreposta com a banda em  $1578 \text{ cm}^{-1}$  poderia corresponder à banda de amida I de proteínas (Barth, 2007). A banda em  $1067 \text{ cm}^{-1}$  também presente em ambos os espectros poderia ser assinalada como correspondente à vibração C-O, presente em proteínas e polissacarídeos (Prakasha,

et al. 2013). As duas diferenças mais marcantes entre os dois espectros é o aparecimento de uma banda em  $1351\text{ cm}^{-1}$  e desaparecimento de banda em  $1155\text{ cm}^{-1}$  com a formação de nanopartículas.



**Figura 39.** Espectros na região do infravermelho de extrato bacteriano de Xac e AgCl NP correspondente.

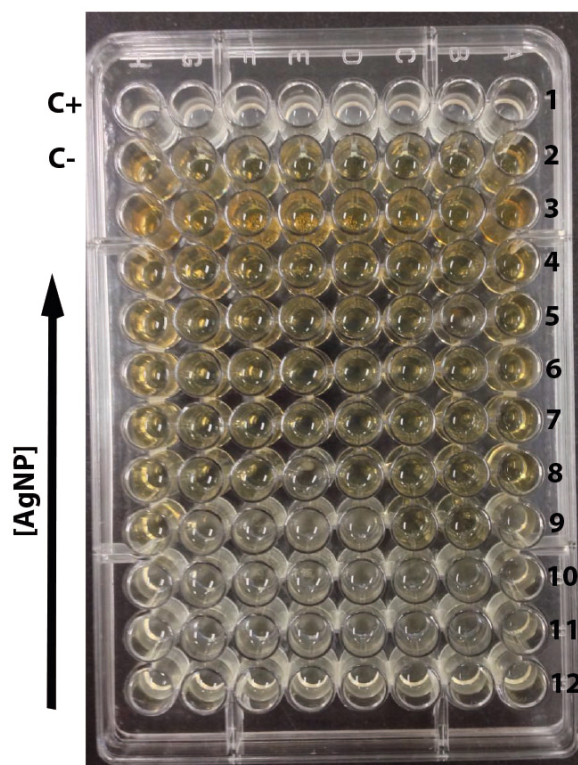
A emissão de fluorescência do extrato bacteriano após excitação em 280 nm é centralizada em 366 nm, sendo suprimida após a formação de nanopartículas, como mostrado na Figura 40. Este fenômeno de supressão do sinal (*quenching*) pode ser originado pela associação de proteínas com as nanopartículas, de forma que os resíduos hidrofóbicos responsáveis pela fluorescência interagem com a superfície dos nanocristais. Esta interação poderia então diminuir a porcentagem de espécies que são excitadas para um nível superior de energia. Neste caso, em princípio nenhuma espécie foi oxidada (como ocorre na formação de AgNP), o que descarta a possibilidade de diminuição da emissão de fluorescência por um consumo de compostos aromáticos/fenólicos. Com a formação das nanopartículas, também, há um leve deslocamento do máximo de emissão de 366 para 363 nm.



**Figura 40.** Espectros de emissão de fluorescência do extrato bacteriano de *Xac* (diluído 2 vezes em água) e da suspensão de nanopartículas de cloreto de prata correspondente após excitação das amostras em 280 nm (concentração proteica de  $2,2 \pm 0,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

#### 4.5 Ensaios de Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os ensaios de concentração inibitória mínima em placas de 96 poços foram utilizados para avaliar a capacidade bacteriostática das AgNP 1, 2, 3 e AgCl NP (Tabela 1). A Figura 41 mostra um exemplo de placa de 96 poços após o período de incubação da bactéria na presença de um gradiente de concentrações de nanopartículas.



**Figura 41.** Exemplo de microplaca de 96 poços após ensaio de CIM com *Xac* e AgNP 1. A linha 1 é um controle positivo, a linha 2 é um controle negativo, a linha 3 é a solução estoque de AgNP 1, e das linhas 4 a 12 foi feito um gradiente decrescente de concentração de AgNP.

Nos poços onde há crescimento bacteriano, a solução torna-se turva, como é o caso dos poços das linhas 9, 10, 11 e 12 do exemplo da Figura 40. A primeira linha na qual os poços não demonstram crescimento bacteriano tem a sua concentração tida como a concentração inibitória mínima. A Tabela 5 mostra as CIM obtidas para as suspensões de nanopartículas testadas.

**Tabela 5.** Resumo de ensaios de Concentração Inibitória Mínima

AgNP	Tipo	CIM ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
1	Extrato de casca fresca de laranja	$22 \pm 2$
2	Extrato de casca seca de laranja	$34 \pm 2$
3	Hesperidina e nanocelulose	$24 \pm 2$
AgCl NP	Extrato bacteriano	$25 \pm 5$

Todas as nanopartículas produzidas inibiram o crescimento bacteriano em baixas concentrações. No entanto, uma diferença significativa é observada no valor de CIM para as AgNP 2, sendo este valor consideravelmente maior que os demais.

Este fato pode ser explicado pelo baixo rendimento da síntese de AgNP pelo extrato de casca seca de laranja (de 48%, como consta na Tabela 3). O maior tempo de exposição da casca à atmosfera em temperaturas moderadamente altas (60-80 °C) pode ter favorecido a degradação de agentes redutores que muito possivelmente estão presentes no extrato da casca, como o ácido ascórbico e açúcares redutores, por exemplo. A menor concentração de nanopartículas de prata pode ter então atenuado a capacidade bacteriostática da suspensão. Este fato vai de encontro com o que já foi exposto no item 1.5, o qual contém uma discussão de que uma das vantagens do uso de nanopartículas de prata em relação ao uso de sais de prata é o maior potencial antimicrobiano do primeiro em relação ao último.

Um ponto relevante a ser destacado é que o próprio extrato da casca poderia conter compostos de caráter antibacteriano relacionados à defesa da planta contra agentes externos (como a própria *Xac*). Para verificar que a atividade antimicrobiana relatada fosse associada apenas à ação das nanopartículas de prata, o mesmo ensaio de CIM foi realizado utilizando apenas o extrato nas mesmas proporções dos outros ensaios, porém substituindo-se solução de  $\text{AgNO}_3$  por água destilada. Foi observado crescimento pleno da bactéria em todas as concentrações do extrato, confirmando assim que o efeito antimicrobiano observado se deve apenas às AgNP.

As nanopartículas de cloreto de prata produzidas a partir do extrato bacteriano de *Xac*, por mais que não sejam compostas por prata em seu estado elementar, também apresentaram atividade bacteriostática contra a própria *Xac*, o que vai de encontro com dados já reportados pela literatura sobre AgCl NP ativas contra determinadas cepas de bactérias (Stalin Dhas et al. 2014; Trinh, Nguyen e Nguyen, 2015) e até mesmo fungos (Paulkumar et al. 2013). No entanto, pouco se sabe em relação ao mecanismo de ação destas nanopartículas, quando comparado ao grande esforço que vem sendo colocado na elucidação de mecanismos de ação de AgNP.

De forma geral, as nanopartículas aqui produzidas são ligeiramente menos potentes em relação à AgNP biogênica sintetizada a partir de filtrado fúngico de *Fusarium oxysporum* pelo mesmo grupo de pesquisa, que possui CIM de  $6,55 \mu\text{g mL}^{-1}$  frente à *Xac* (Ballottin, et al. 2017). No entanto, a CIM ainda situa-se na mesma ordem de grandeza e apresenta-se como uma concentração que seria passível de ser utilizada no campo em futuros testes *in vivo*.

#### 4.6 Formulação de agroquímico contendo AgNP

No contexto de produtos aplicados à agricultura, o ingrediente ativo não é o único componente do agroquímico a ser levado em conta. Na prática, adjuvantes são adicionados à formulação original para conferir propriedades específicas ao agroquímico que facilitem a sua absorção. Um futuro candidato à agroquímico contendo AgNP deve ser utilizado na forma de *spray* em plantas afetadas pelo cancro cítrico e, em contato com as folhas, o nanomaterial deve penetrar a cutícula e a epiderme para atingir o mesofilo, que é o local de proliferação da *Xac* (Ryan et al. 2011). Desta forma, foram feitos testes preliminares com agentes espessantes, que diminuem o *drift* de gotículas na superfície da folha (Hilz e Vermeer, 2013) e também agentes espalhantes, que diminuem a tensão superficial do líquido, o que aumenta a área espalhada do líquido na folha.

No caso de agentes espalhantes, tensoativos ou surfactantes são comumente utilizados. No contexto de agricultura, tensoativos não-iônicos são preferidos em relação aos aniônicos e especialmente aos catiônicos, uma vez que estes últimos possuem alta probabilidade de interação com membranas celulares, mostrando assim alta toxicidade (Castro, Ojeda e Cirelli, 2013). O oleato de sorbitano (ou Span® 80) é um tensoativo não-iônico com baixa toxicidade que apresentou bons resultados ao não perturbar a distribuição de tamanho das nanopartículas (AgNP 1) na concentração de 0,05% (v/v), como mostrado na Tabela 6. Visualmente, a presença deste adjuvante aumentou consideravelmente a afinidade do produto com a superfície da folha, como mostrado na Figura 42c.



**Tabela 6.** Dados físico-químicos da suspensão de AgNP 1 na presença e ausência de adjuvantes

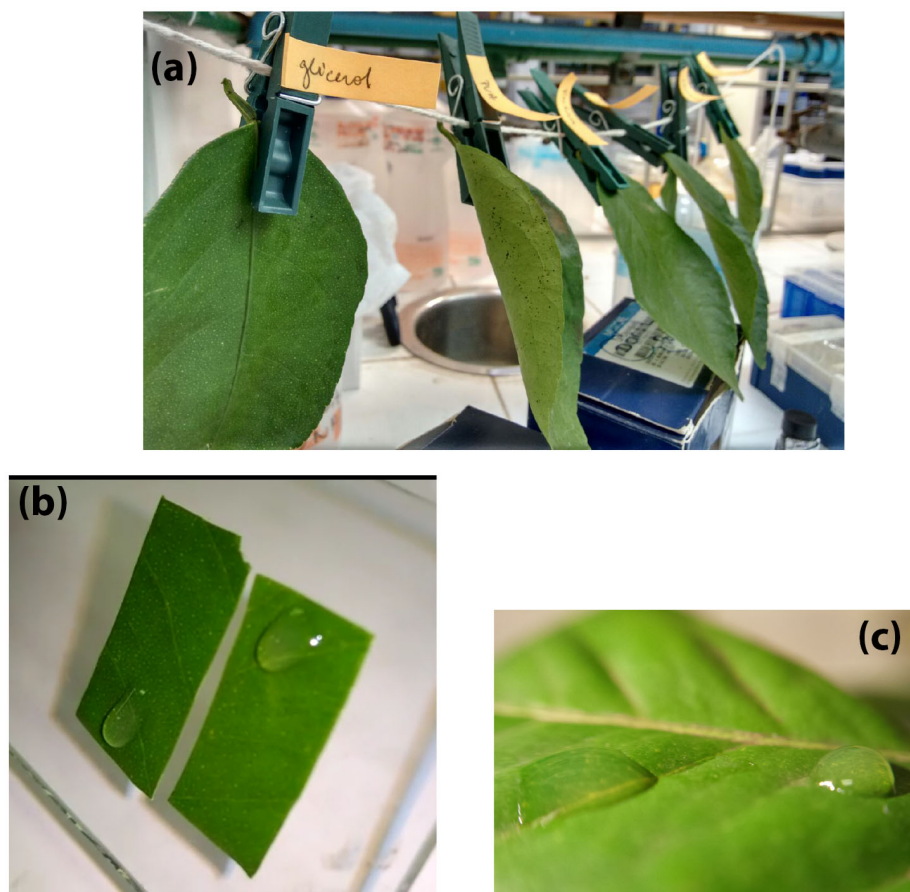
Tipo	Tamanho por DLS / nm	Polidispersidade	Potencial zeta / mV	Tensão superficial / mN m <sup>-1</sup>	Viscosidade dinâmica* / Ns m <sup>-2</sup>
<b>AgNP 1</b>	239 ± 1	0,287	-19,0 ± 0,4	59,98 ± 0,3	0,893x10 <sup>-3</sup>
<b>AgNP 1 + 0,2% glicerol</b>	223 ± 6	0,299	-21,5 ± 0,2	N/A	0,947x10 <sup>-3</sup>
<b>AgNP 1 + 0,05% oleato de sorbitano</b>	292 ± 5	0,255	-31,7 ± 2,3	N/A	0,893x10 <sup>-3</sup>
<b>AgNP 1 + 0,05% oleato de sorbitano + 0,2% glicerol</b>	240 ± 11	0,335	-44,8 ± 2,4	29,38 ± 0,2	0,947x10 <sup>-3</sup>

\*Os valores de viscosidade dinâmica foram estimados com base em medições já descritas pela literatura (Cheng, 2008).

Por outro lado, agentes espessantes possuem uma menor gama de possíveis compostos a serem utilizados. Geralmente, podem ser óleos (na forma de emulsão), polímeros ou compostos viscosos. Neste caso, procurou-se um composto com baixa toxicidade e altamente hidrofílico, além de barato. O glicerol na concentração de 0,2% atendeu todos estes requisitos, além de também não modificar o padrão de distribuição de tamanhos do nanomaterial. Visualmente, a adição de glicerol tem o efeito de aumentar a viscosidade do produto, diminuindo a mobilidade de gotas na superfície da folha (Figura 42b).

Como verificado na Tabela 6, a adição dos adjuvantes não mudou significativamente o tamanho médio e a polidispersidade das nanopartículas. O valor de potencial zeta teve grandes variações, porém sempre para maiores valores, em módulo. Este efeito representa um ganho em estabilização eletrostática, o que pode

sugerir que a suspensão possa ser mais estável e ganhar tempo de vida útil quando na presença destes adjuvantes.



**Figura 42.** (a) Folhas de *Citrus* utilizadas para verificação visual de alterações nas propriedades físico-químicas da suspensão de AgNP 1. (b) Efeito da adição de glicerol 0,2% (gota à direita) na viscosidade da suspensão. (c) Efeito da adição de oleato de sorbitano 0,05% (gota à esquerda) no espalhamento da suspensão.

Utilizando o mesmo procedimento descrito no item 3.5, um ensaio de CIM foi feito para avaliar quaisquer mudanças na inibição do crescimento da *Xac* na presença de tais adjuvantes. O valor de CIM permaneceu inalterado mesmo com a adição de oleato de sorbitano e glicerol na suspensão, o que sugere que a presença destes compostos não exerce qualquer influência no mecanismo bacteriostático provido pelas nanopartículas.

É importante notar que, no caso das nanopartículas serem, de fato, aplicadas desta forma, parte do produto poderá não ser absorvido pela planta, caindo no solo. Em tempos prolongados, as nanopartículas de prata poderão ser

oxidadas ao ar, gerando espécies de óxido de prata. Estes compostos, por sua vez, apresentam uma inércia química muito maior quando comparada à prata metálica, e portanto não trariam danos aos micro-organismos benéficos do solo. Além disso, a presença de ácidos húmicos e fúlvicos (produtos finais de decomposição de matéria orgânica) poderia neutralizar a prata desviada ao solo. Gunsolus et al. (2015) reportaram um estudo de interações entre tais ácidos e AgNP, chegando à conclusão que a atividade antimicrobiana das nanopartículas é reduzida na presença deste compostos, especialmente quando os mesmos são ricos em nitrogênio e enxofre. Os ácidos húmicos e fúlvicos, ao se associarem com a nanop prata, podem diminuir a sua dissolução no meio onde se encontram, reduzindo assim o seu impacto ambiental.

## 5. CONCLUSÃO

Essa pesquisa envolveu a produção de nanopartículas de prata através de duas rotas principais, sendo a primeira utilizando extratos de casca de laranja (fresco e seco) e, a outra, utilizando hesperidina e nanocelulose. No primeiro caso, a síntese utilizando extratos de casca fresca e seca resultou na formação de nanopartículas de tamanho semelhante ( $48,1 \pm 20,5$  nm e  $40,7 \pm 16,2$  nm, respectivamente). Porém, a atividade antimicrobiana frente à *Xac* destas AgNP foi distinta, sendo de  $22 \pm 2$   $\mu\text{g mL}^{-1}$  contra  $34 \pm 2$   $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. Essa diferença poderia ser explicada por um menor rendimento da reação de formação de AgNP pelo extrato de casca seca (83% em contraste com 48%). Também, pode indicar que os agentes redutores nesta rota biogênica, tais como, compostos antioxidantes, de fácil degradação ao ar à temperaturas elevadas (60-80 °C), sofreram degradação durante a secagem da casca de laranja. Em termos de estabilização destas nanopartículas, sugere-se a participação de proteínas, uma vez que os ensaios de quantificação pelo método de Bradford acusaram um decréscimo de conteúdo proteico na solução após a formação de AgNP. Através de géis de poliacrilamida (SDS-PAGE 15%), foi observado padrão distinto de distribuição de proteínas nos extratos e na suspensão de AgNP. Os resultados obtidos pelas técnicas espectroscópicas, como espectroscopia na região do infravermelho e espectroscopia Raman, sugerem que, além de proteínas (que interagem com a prata por meio de grupos contendo nitrogênio, oxigênio e enxofre), açúcares também podem participar da estabilização das nanopartículas por meio de interações com seus grupos hidroxila.

Por outro lado, a segunda rota de produção de AgNP mostrou-se mais adequada para obtenção de AgNP com a forma e tamanho bastante uniformes ( $25,4 \pm 12,5$  nm), além de apresentar um alto rendimento de reação, de 99%. A estabilidade coloidal deste sistema também é melhor, tendo em vista uma alta repulsão eletrostática entre as nanopartículas, além de uma prevenção de agregação por impedimento estérico provido pela nanocelulose. Esta rota sintética, por mais que leve à nanopartículas mais estáveis e homogêneas, envolve uma extração prévia de componentes do resíduo da laranja, o que representa um custo maior do processo em relação à síntese de AgNP utilizando extratos.

Paralelamente às AgNP produzidas a partir de resíduos da laranja, também foram produzidas nanopartículas de cloreto de prata (AgCl NP) a partir de extrato intracelular bacteriano da *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. Tal rota é interessante sob o ponto de vista de que o próprio micro-organismo fitopatogênico é utilizado para formar um nanomaterial que é ativo contra a mesma bactéria (CIM =  $25 \pm 5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Também, filmes de nanocelulose extraída de bagaço industrial de laranja reforçados com álcool polivinílico (PVA) e contendo nanopartículas de prata (AgNP 3) foram produzidos e caracterizados por análise termogravimétrica, difração de raios X e espectroscopia na região do infravermelho. Este material se mostrou resistente mecanicamente e termicamente e abre uma gama de possíveis aplicações como membrana ou papel de embalagem antimicrobiano, por exemplo.

Finalmente, todas as nanopartículas produzidas se mostraram eficazes na inibição do crescimento de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, a bactéria causadora do cancro cítrico em plantações de laranja da espécie *Citrus sinensis* no Brasil. Espera-se que os futuros testes *in vivo* em plantações de laranja infectadas com a *Xac* utilizando formulações contendo as nanopartículas aqui descritas na forma de um *spray* apresentaram resultados positivos e abriram a perspectiva de uso de um agroquímico potente.

## REFERÊNCIAS

- Abitbol, T.; Rivkin, A.; Cao, Y.; et al. Nanocellulose, a tiny fiber with huge applications. *Curr Opin Biotechnol*, **2016**, 39, 76-88.
- Aebersold, R.; Mann, M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, **2003**, 422, 198-207.
- Agnihotri, S.; Mukherji, S.; Mukherji, S. Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. *RSC Adv*, **2014**, 4, 3974–3983.
- Ahmed, S.; Ahmad, M.; Swami, B. L.; et al. A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise. *J Adv Res*, **2016**, 7, 17-28.
- Ahmed, S.; Saifullah, A. M.; Swami, B. L.; et al. Green synthesis of silver nanoparticles using *Azadirachta indica* aqueous leaf extract. *JRRAS*, **2016**, 9, 1-7.
- Ajitha, B.; Reddy, Y.; Reddy, P. S.; et al. Role of capping agents in controlling silver nanoparticles size, antibacterial activity and potential application as optical hydrogen peroxide sensor. *RSC Adv*, **2016**, 6, 36171–36179.
- Alegria, M.; Souza, D.; Andrade, M.; et al. (2005). Identification of new protein-protein interactions involving the products of the chromosome- and plasmid-encoded type IV secretion loci of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *J Bacteriol*, **2005**, 187, 2315-2325.
- Amendola, V.; Bakr, O. M.; Stellacci, F. A study of the surface plasmon resonance of silver nanoparticles by the discrete dipole approximation method: effect of shape, size, structure, and assembly. *Plasmonics*, **2010**, 5, 85–97.
- Anker, J. N.; Hall, W. P.; Lyandres, O.; et al. Biosensing with plasmonic nanosensors. *Nat Mater*, **2008**, 7, 442-453.

Aragão, A. Z. B.; Balloni, M.; Simabuco, F.; et al. Novel processed form of Syndecan-1 shed from SCC-9 cells play a role in cell migration.

Arruda, S.; Silva, A.; Galazzi, R.; Azevedo, R.; Arruda, M. Nanoparticles applied to plant science: A review. *Talanta*, **2015**, *131*, 693–705.

Asgary, V.; Shoari, A.; Baghbani-Arani, F.; et al. Green synthesis and evaluation of silver nanoparticles as adjuvant in rabies veterinary vaccine. *Int J Nanomedicine*, **2016**, *11*, 3597–3605.

Azeredo, H. M. C.; Rosa, M. F.; Mattoso, L. H. C. Nanocellulose in bio-based food packaging applications. *Ind Crops Prod*, **2017**, *97*, 664–671.

Ballottin, D.; Fulaz, S.; Cabrini, F.; et al. Antimicrobial textiles: biogenic silver nanoparticles against *Candida* and *Xanthomonas*. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, **2017**, *75*, 582–589.

Ballotin, D.; Fulaz, S.; Souza, M. L.; et al. Elucidating protein involvement in the stabilization of the biogenic silver nanoparticles. *Nanoscale Res Lett*, **2016**, *11*, 1–9.

Ban, D. K., Paul, S. Protein corona over silver nanoparticles triggers conformational change of proteins and drop in bactericidal potential of nanoparticles: Polyethylene glycol capping as preventive strategy. *Colloids Surf B Biointerfaces*, **2016**, *146*, 577–584.

Bansod, S. D.; Bawaskar, M. S.; Gade, A. K.; et al. Development of shampoo, soap and ointment formulated by green synthesised silver nanoparticles functionalised with antimicrobial plants oils in veterinary dermatology: treatment and prevention strategies. *IET Nanobiotechnol*, **2015**, *9*, 165–71.

Bar, H.; Bhui, D. K.; Sahoo, G.; et al. Green synthesis of silver nanoparticles using latex of *Jatropha curcas*. *Colloids Surf A*, **2009**, *339*, 134–139.

Barth, A. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochim Biophys Acta*, **2007**, *1767*, 1073–1101.

Bastus, N. G.; Merkoçi, F.; Piella, J.; et al. Synthesis of highly monodisperse citrate-stabilized silver nanoparticles of up to 200 nm: kinetic control and catalytic properties. *Chem Mater*, **2014**, 26, 2836–2846.

Becker, R.; Döring, W. Kinetic treatment of germ formation in supersaturated vapour. *Ann Phys*, **1935**, 24, 719–752.

Benyettou, F., Rezgui, R., Ravau, F., et al. Synthesis of silver nanoparticles for the dual delivery of doxorubicin and alendronate to cancer cells. *J Mater Chem B*, **2015**, 3, 7237–7245.

Birkholz, M. *Thin Film Analysis by X-Ray Scattering*. Weinheim: Wiley-VCH, **2006**.

Borrego, B.; Lorenzo, G.; Mota-Morales, J. D.; et al. Potential application of silver nanoparticles to control the infectivity of Rift Valley fever virus in vitro and in vivo. *Nanomedicine: NBM*, **2016**, 12, 1185–1192.

Blout, E. R.; Karplus, R. The infrared spectrum of polyvinyl alcohol. *J Am Chem Soc*, **1948**, 70, 862–864.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **1976**, 72, 248–254.

Burning, A.; Gabriel, D. W. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. *Mol Plant Pathol*, **2003**, 4, 1364–3703.

Cai, S.; Singh, B. Identification of beta-turn and random coil amide III infrared bands for secondary structure estimation of proteins. *Biophys Chem*, **1999**, 80, 7–20.

Cao, W.; Hu, S. S.; Li, X. Y.; et al. Highly sensitive analysis of flavonoids by zwitterionic microemulsion electrokinetic chromatography coupled with light-emitting diode-induced fluorescence detection. *J Chromatogr A*, **2014**, 1358, 277–284.

Carbone, M.; Donia, D. T.; Sabbatella, G.; et al. Silver nanoparticles in polymeric matrices for fresh food packaging. *JKSUS*, **2016**, 28, 273–279.



Castro, M. J. L.; Ojeda, C.; Cirelli, A. F. Surfactants in agriculture. Em: E, Litchfouse et al. *Green materials for energy, products and depollution*. New York: Springer Science, **2013**.

Cavassin, E. D.; Figueiredo, L. F.; Otoch, J. P.; et al. Comparison of methods to detect the in vitro activity of silver nanoparticles (AgNP) against multidrug resistant bacteria. *J Nanobiotechnol*, **2015**, 13, 64-80.

Chandrappa, C. P.; Govindappa, M.; Chandrasekar, N. Endophytic synthesis of silver chloride nanoparticles from *Penicillium sp.* of *Calophyllum apetalum*. *Adv Nat Sci Nanosci Nanotechnol*, **2016**, 7, 1-5.

Cheng, N. Formula for the viscosity of a glycerol-water mixture. *Ind Eng Chem Res*, **2008**, 47, 3285-3288.

Cinnamea, E. M.; Stefani, P. M.; Ruseckaite, R. A. Medium-density particleboards from modified rice husks and soybean protein concentrate-based adhesives. *Bioresourc Technol*, **2010**, 101, 818-825.

Citrus: World Markets and Trade, *United States Department of Agriculture*, **2017** (documento *online* acessado em 15/07/2017).

Corrêa, D.; Ramos, C. The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. *Afr J Biochem Res*, **2009**, 3, 164-173.

Culha, M.; Cullum, B.; Lavrik, N.; et al. Surface-enhanced Raman scattering as an emerging characterization and detection technique. *J Nanotechnol*, **2012**, 2012, 1-12.

Cypriano, D. Z.; Lopes da Silva, L.; Bohórquez, M. A.; et al. A biomassa da laranja e seus subprodutos. *Rev Virtual Quim*, **2017**, 9, 176-191.

Dahneke, B. *Measurement of suspended particles by quasi-elastic light scattering*. New York: Wiley, **1983**.

Dai, T.; Huang, Y. Y.; Sharma, S. K.; et al. Topical antimicrobials for burn wound infections. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*, **2010**, *5*, 124–151.

Das, A. K. Citrus canker – A review. *J Appl Hort*, **2003**, *5*, 52-60.

Dollish, F. *Characteristic Raman frequencies of organic compounds*. New York: Willey & Sons, **1974**.

Dubas, S. T.; Kumlangdudsana, P.; Potiyaraj, P. Layer-by-layer deposition of antimicrobial silver nanoparticles on textile fibers. *Colloids Surf A*, **2006**, *289*, 105–109.

Durán, N.; Durán, M.; de Souza, C. E. Silver and silver chloride nanoparticles and their anti-tick activity: a mini review. *J Braz Chem Soc*, **2017**, *00*, 1-7.

Durán, N.; Marcato, P. D.; De Conti, R.; et al. Potential use of silver nanoparticles on pathogenic bacteria, their toxicity and possible mechanisms of action. *J Braz Chem Soc*, **2010**, *21*, 949-959.

Durán, N.; Nakazato, G.; Seabra, A. Antimicrobial activity of biogenic silver nanoparticles, and silver chloride nanoparticles: an overview and comments. *Appl Microbiol Biotechnol*, **2016**, *100*, 6555- 6570.

Durán, N.; Silveira, C. P.; Durán M., et al. Silver nanoparticle protein corona and toxicity: a mini-review. *J Nanobiotechnol*, **2015**, *13*, 55-72.

Eccles, J. W.; Bangert, U.; Bromfield, M.; et al. UV-Vis plasmon studies of metal nanoparticles. *JPCS*, **2010**, *241*, 1-4.

El-Aneed, A.; Cohen, A.; Banoub, J. Mass spectrometry, review of the basics: electrospray, MALDI, and commonly used mass analyzers. *Appl Spectrosc Rev*, **2009**, *44*, 210-230.

Elzey, S.; Grassian, V. H. Agglomeration, isolation and dissolution of commercially manufactured silver nanoparticles in aqueous environments. *J Nanopart Res*, **2010**, *12*, 1945–1958.

Erni, R.; Rossell, M. D.; Kisielowski, C.; et al. Atomic-resolution imaging with a sub-50-pm electron probe. *Phys Rev Lett*, **2009**, *102*, 096101-1-096101-4.

Eugenio, M.; Müller, N.; Frases, S.; et al. Yeast-derived biosynthesis of silver/silver chloride nanoparticles and their antiproliferative activity against bacteria. *RSC Adv*, **2016**, *6*, 9893–9904.

Feng, H. -L.; Gao, X. -Y.; Zhang, Z. -Y., et al. Study on the crystalline structure and the thermal stability of silver-oxide films deposited by using direct-current reactive magnetron sputtering methods. *J Korean Phys Soc*, **2010**, *56*, 1176-1179.

Feng, Q.; Wu, J.; Chen, G.; et al. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Biomed Mater Res*, **2000**, *52*, 662-668.

Filipe, V.; Hawe, A.; Jiskoot, W. Critical evaluation of nanoparticle tracking analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. *Pharm Res*, **2010**, *27*, 796-810.

Filippo, E.; Manno, D.; Buccolieri, A.; et al. Shape-dependent plasmon resonances of Ag nanostructures. *Superlattices and Microstruct*, **2010**, *47*, 66–71.

Frank, A. J.; Cathcart, N.; Maly, K. E.; et al. Synthesis of silver nanoprisms with variable size and investigation of their optical properties: a first-year undergraduate experiment exploring plasmonic nanoparticles. *J Chem Educ*, **2010**, *87*, 1098-1101.

Gade, A.; Gaikwad, S.; Duran, N.; et al. Green synthesis of silver nanoparticles by *Phoma glomerata*. *Micron*, **2014**, *59*, 52–59.

Gajbhiye, S.; Sakharwade, S. Silver nanoparticles in cosmetics. *JCDSA*, **2016**, *6*, 48-53.

Gnanadhas, D. P.; Thomas, M. B.; Thomas, R.; et al. Interaction of silver nanoparticles with serum proteins affects their antimicrobial activity in vivo. *Antimicrob Agents Chemother*, **2013**, *57*, 4945– 4955.

Gou, Y.; Zhang, F.; Zhu, X.; et al. Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using *Sphingomonas paucimobilis* sp. BDS1. *IET Nanobiotechnol*, **2015**, 9, 53-57.

Graham, J. H.; Gottwald, T. R.; Cubero, J.; et al. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker. *Mol Plant Pathol*, **2004**, 5, 1–15.

Gunasekaran, T.; Nigusse, T.; Dhanaraju, M. D. Silver nanoparticles as real topical bullets for wound healing. *J Am Coll Clin Wound Spec*, **2012**, 3, 82–96.

Gunsolus, I. L.; Mousavi, M. P. S.; Hussein, K.; et al. Effects of humic and fulvic acids on silver nanoparticle stability, dissolution and toxicity. *Environ Sci Technol*, **2015**, 49, 8078-8086.

Guo, H.; Xing, B.; White, J.; et al. Ultra-sensitive determination of silver nanoparticles by surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) after hydrophobization mediated extraction. *Analys*, **2016**, 141, 5261-5264.

Guo, H.; Zhang, Z.; Xing, B.; et al. Analysis of silver nanoparticles in antimicrobial products using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS). *Environ Sci Technol*, **2015**, 49, 4317–4324.

Henglein, A.; Giersig, M. Formation of colloidal silver nanoparticles: capping action of citrate. *J Phys Chem B*, **1999**, 103, 9533-9539.

Hilz, E.; Vermeer, A. W. P. Spray drift review: The extent to which a formulation can contribute to spray drift reduction. *Crop Prot*, **2013**, 44, 75-83.

Hu, L.; Zheng, G.; Yao, J.; et al. Transparent and conductive paper from nanocellulose fibers. *Energy Environ Sci*, **2013**, 6, 513-518.

Hunter, R. J. *Zeta Potential in Colloid Science: Principles and Applications*. Oxford: Academic Press, **1981**.

Ikan, R. *Natural Products: a laboratory guide*. Cambridge: Academic Press, **1991**.

Iravani, S.; Korbekandi, H.; Mirmohammadi, S. V., et al. Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. *Res Pharm Sci*, **2014**, *9*, 385–406.

Islan, G. A.; Durán, M.; Cacicedo, M. L.; et al.. Nanopharmaceuticals as a solution to neglected diseases: Is it possible? *Acta Trop*, **2017**, *170*, 16-42.

Joy, D. C.; Howitt, D. G. *Encyclopedia of Physical Science and Technology*. California: Academic Press, **2003**.

Júnior, J.; Baldo, J. B. The behavior of zeta potential of silica suspensions. *NJGC*, **2014**, *4*, 29-37.

Jyoti, K.; Baunthiyal, M.; Singh, A. Characterization of silver nanoparticles synthesized using *Urtica dioica* Linn. leaves and their synergistic effects with antibiotics. *JRRAS*, **2016**, *9*, 217-227.

Kelly, K. L.; Coronado, E.; Zhao, L. L.; et al. The optical properties of metal nanoparticles: the influence of size, shape, and dielectric environment. *J Phys Chem B*, **2003**, *107*, 668-677.

Khalil, M.; Ismail, E.; El-Baghdady, K.; et al. Green synthesis of silver nanoparticles using olive leaf extract and its antibacterial activity. *Arab J Chem*, **2014**, *7*, 1131–1139.

Khan, M.; Kumar, S.; Ahamed, M.; et al. Structural and thermal studies of silver nanoparticles and electrical transport study of their thin films. *Nanoscale Res Lett*, **2011**, *6*, 434-442.

Khater, L.; Santos, T. M.; Alegria, M. C.; et al. In silico identification of potential chaperone genes that belong to type III and type IV secretion systems in *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*. *Gent Mol Biol*, **2005**, *28*, 321-327.

Kim, J. –H.; Shim, B. S.; Kim, H. S.; et al. Review of nanocellulose for sustainable future materials. *IJPEM-GT*, **2015**, 2, 197-213.

Kim, P.; Ribbe, A.; Russell, T.; et al. Visualizing the dynamics of nanoparticles in liquids by Scanning Electron Microscopy. *ACS Nano*, **2016**, 10, 6257–6264.

Kim, S. J.; Park, S. J.; Kim, I. Y.; et al. Thermal characteristics of poly(vinyl alcohol) and poly(vinylpyrrolidone) IPNs. *J Appl Polym Sci*, **2002**, 86, 1844-1847.

Koh, A. L.; Bao, K.; Khan, I.; et al. Electron Energy-Loss Spectroscopy (EELS) of surface plasmons in single silver nanoparticles and dimers: influence of beam damage and mapping of dark modes. *ACS Nano*, **2009**, 3, 3015–3022.

Koole, R.; Groeneveld, E.; Vanmaekelbergh, D.; et al. Size effects on semiconductor nanoparticles. In C. Mello Donegá, *Nanoparticles: Workhorses of Nanoscience* (pp. 13-51). New York: Springer, **2014**.

Korbekandi, H.; Chitsazi, M. R.; Asghari, G.; et al. Green biosynthesis of silver nanoparticles using *Quercus brantii* (oak) leaves hydroalcoholic extract. *Pharm Biol*, **2015**, 53, 807-812.

La Mer, V. K. Nucleation in phase transitions. *Ind Eng Chem*, **1952**, 44, 1270-1277.

Laera, S.; Ceccone, G.; Rossi, F.; et al. *Nano Lett*, **2011**, 11, 4480–4484.

Lakowicz, J. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. New York: Springer, **2006**.

Larue, C.; Castillo-Michel, H.; Sobanska, S.; et al. Foliar exposure of the crop *Lactuca sativa* to silver nanoparticles: Evidence for internalization and changes in Ag speciation. *J Hazard Mater*, **2014**, 264, 98–106.

Leach, S. *Physical Principles and Techniques of Protein Chemistry*. Cambridge: Academic Press, **1969**.

Lee, S. –H.; Mohan, D. J.; Kang, I. –A.; et al. Nanocellulose reinforced PVA composite films: effects of acid treatment and filler loading. *Fibers and Polymers*, **2009**, 10, 77-82.

Li, J.; Wei, X.; Wang, Q. Homogeneous isolation of nanocellulose from sugarcane bagasse by high pressure homogenization. *Carbohydr Polym*, **2012**, *90*, 1609-1613.

Li, T.; Park, H.; Lee, H. S.; et al. Circular dichroism study of chiral biomolecules conjugated with silver nanoparticles. *Nanotechnology*, **2004**, *15*, 660–663.

Li, Y. S.; Cheng, J.; Chung, K. T. Surface-enhanced Raman spectroscopy using silver nanoparticles on a precoated microscope slide. *Spectrochim Acta Mol Biomol Spectrosc*, **2008**, *69*, 524–527.

Li, W.; Xie, X.; Shi, Q.; et al. Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, **2010**, *85*, 1115–1122.

Lok, C. N.; Ho, C. M.; Chen, R.; et al. Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. *J Proteome Res*, **2006**, *5*, 916-924.

Ludeña, L.; Fasce, D.; Alvarez, V. A.; et al. Nanocellulose from rice husk following alkaline treatment to remove silica. *Bioresources*, **2011**, *6*, 1440-1453.

Luque, R.; Ojeda, M.; Garcia, A.; et al. Evaluation of biomass-derived stabilising agents for colloidal silver nanoparticles via nanoparticle tracking analysis (NTA). *RSC Adv*, **2013**, *3*, 7119–7123.

Malassis, L.; Dreyfus, R.; Murphy, R.; et al. One-step green synthesis of gold and silver nanoparticles with ascorbic acid and their versatile surface post-functionalization. *RSC Adv*, **2016**, *6*, 1-9.

Mallikarjuna, K.; Sushma, N. J.; Narasimha, G.; et al. Phytochemical fabrication and characterization of silver nanoparticles by using Pepper leaf broth. *Arab J Chem*, **2014**, *7*, 1099–1103.

Mallmann, E.; Cunha, F. A.; Castro, B. N.; et al. Antifungal activity of silver nanoparticles obtained by green synthesis. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, **2015**, *57*, 165-167.

Mansfield, E.; Tyner, K.; Poling, C.; et al. Determination of nanoparticle surface coatings and nanoparticle purity using microscale thermogravimetric analysis. *Anal Chem*, **2014**, *86*, 1478–1484.

Mariño, M.; Lopes da Silva, L.; Durán, N.; Tasic, L. Enhanced materials from nature: nanocellulose from citrus waste. *Molecules*, **2015**, *20*, 5908–5923.

Mazzarino, L.; Travelet, C.; Ortega-Murillo, S.; et al. Elaboration of chitosan-coated nanoparticles loaded with curcumin for mucoadhesive applications. *J Colloid Interface Sci*, **2012**, *370*, 58–66.

McMahon, G. *Analytical Instrumentation: A Guide to Laboratory, Portable and Miniaturized Instruments*. New Jersey: John Wiley & Sons, **2007**.

Medda, S.; Hajra, A.; Dey, U.; et al. Biosynthesis of silver nanoparticles from Aloe vera leaf extract and antifungal activity against *Rhizopus sp.* and *Aspergillus sp.* *Appl Nanosci*, **2015**, *5*, 875–880.

Mellema, M.; Stoller, M.; Queau, Y.; et al. Nanoparticle Tracking Analysis for the enumeration and characterization of mineralo-organic nanoparticles in feline urine. *PLoS ONE*, **2016**, *11*, 1–12.

Mendes, J. S.; Santiago, A. S.; Toledo, M. A.; et al. In vitro determination of extracellular proteins from *Xylella fastidiosa*. *Front Microbiol*, **2016**, *7*, 1–15.

Meng, X. K.; Tang, S. C.; Vongehr, S. A review on diverse silver nanostructures. *J Mater Sci Technol*, **2010**, *26*, 487–522.

Mitin, V. V.; Sementsov, D. I.; Vagidov, N. Z. *Quantum Mechanics for Nanostructures*. Cambridge: Cambridge University Press, **2010**.

Miyahara, T.; Nakatsuji, H.; Sugiyama, H. Helical structure and circular dichroism spectra of DNA: A theoretical study. *J Phys Chem A*, **2013**, *117*, 42–55.



Mogensen, K. B.; Kneipp, K. Size-dependent shifts of plasmon resonance in silver nanoparticle films using controlled dissolution: monitoring the onset of surface screening effects. *J Phys Chem C*, **2014**, *118*, 28075–28083.

Mukherjee, P.; Roy, M.; Mandal, B.; et al. Green synthesis of highly stabilized nanocrystalline silver particles by a non-pathogenic and agriculturally important fungus *T. asperellum*. *Nanotechnol*, **2008**, *19*, 1-7.

Nakamoto, K. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*. Hoboken: John Wiley & Sons, **2009**.

Olesik, J. W. Elemental Analysis using ICP-OES and ICP/MS. *Anal Chem*, **1991**, *63*, 12-21.

Onodera, A.; Nishiumi, F.; Kakiguchi, K.; et al. Short-term changes in intracellular ROS localisation after the silver nanoparticles exposure depending on particle size. *Toxicol Rep*, **2015**, *2*, 574–579.

Palaniraj, A.; Jayaraman, V. Production, recovery and applications of xanthan gum by *Xanthomonas campestris*. *J Food Eng*, **2011**, *106*, 1–12.

Paulkumar, K.; Rajeshkumar, S.; Gnanajobitha, G.; et al. Biosynthesis of silver chloride nanoparticles using *Bacillus subtilis* MTCC 3053 and assessment of its antifungal activity. *ISRN Nanomaterials*, **2013**, *2013*, 1-8.

Park, S.; Baker, J.; Himmel, M.; et al. Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. *Biotechnol Biofuels*, **2010**, *3*, 1-10.

Pelton, J. T.; McLean, L. R. Spectroscopic methods for analysis of protein secondary structure. *Anal Biochem*, **2000**, *277*, 167–176.

Picoli, S.; Durán, M.; Andrade, P.; et al. Silver nanoparticles/silver chloride (Ag/AgCl) synthesized from *Fusarium oxysporum* acting against *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) and extended spectrum beta-lactamase (ESBL). *Front Nanosci Nanotech*, **2016**, *2*, 107-110.

Polte, J. Fundamental growth principles of colloidal metal nanoparticles – a new perspective. *CrystEngComm*, **2015**, *17*, 6809–6830.

Polte, J.; Tuaeov, X.; Wuithschick, M.; et al. Formation mechanism of colloidal silver nanoparticles: analogies and differences to the growth of gold nanoparticles. *ACS Nano*, **2012**, *7*, 5791–5802.

Pontes, J. G.; Ohashi, W. Y.; Brasil, A. J.; et al. Metabolomics by NMR spectroscopy in plant disease diagnostic: Huanglongbing as a case study. *ChemistrySelect*, **2016**, *6*, 1176–1178.

Prabhu, S.; Poulouse, E. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *Int Nano Lett*, **2012**, *2*, 1-10.

Pramanik, S.; Chatterjee, S.; Saha, A.; et al. Unraveling the interaction of silver nanoparticles with mammalian and bacterial DNA. *J Phys Chem B*, **2016**, *120*, 5313–5324.

Prakasha, P.; Gnanaprakasam, P.; Emmanuel, R.; et al. Green synthesis of silver nanoparticles from leaf extract of *Mimusops elengi*, Linn. for enhanced antibacterial activity against multi drug resistant clinical isolates. *Colloids Surf B*, **2013**, *108*, 255–259.

Praphulla, R.; Chandraprasad, M. S.; Lakshmi, Y. N.; et al. Biosynthesis of silver nanoparticles using lemon extract and its antibacterial activity. *Int J Mult Curr Res*, **2014**, *2*, 165-169.

Priyadarshini, S.; Gopinath, V.; Priyadharsshini, N. M.; et al. Synthesis of anisotropic silver nanoparticles using novel strain, *Bacillus flexus* and its biomedical application. *Colloids and Surf B Biointerfaces*, **2013**, *102*, 232–237.

Qin, J.; Burks, T.; Ritenour, M.; et al. Detection of citrus canker using hyperspectral reflectance imaging with spectral information divergence. *J Food Eng*, **2009**, *93*, 183–191.

Rades, S.; Hodoroba, V.; Salge, T.; et al. High-resolution imaging with SEM/T-SEM, EDX and SAM as a combined methodical approach for morphological and elemental analyses of single engineered nanoparticles. *RSC Adv*, **2014**, *4*, 49577–49587.

Rahman, M.; Laurent, S.; Tawil, N.; et al. *Protein-Nanoparticle Interactions: The Bio-Nano Interface*. New York: Springer, **2013**.

Rajan, R.; Chandran, K.; Harper, S. L.; et al. Plant extract synthesized nanoparticles: an ongoing source of novel biocompatible materials. *Ind Crops Prod*, **2015**, *70*, 356–373.

Ricciardi, R.; Auriemma, F.; De Rosa, C.; et al. X-ray diffraction analysis of poly(vinyl alcohol) hydrogels, obtained by freezing and thawing techniques. *Macromolecules*, **2004**, *37*, 1921–1927.

Rigano, L. A.; Siciliano, F.; Enrique, R.; et al. Biofilm formation, epiphytic fitness, and canker development in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *MPMI*, **2007**, *10*, 1222–1230.

Rodrigues, A. G.; Ping, L. Y.; Marcato, P. D.; et al. Biogenic antimicrobial silver nanoparticles produced by fungi. *Appl Microbiol Biotechnol*, **2013**, *97*, 775–782.

Roepstorff, P.; Fohlman J. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed Mass Spectrom*, **1984**, *11*, 601.

Romero-Lopez, M. R.; Osorio-Diaz, P.; Bello-Perez, L. A.; et al. Fiber concentrate from Orange (*Citrus sinensis* L.) bagasse: characterization and application as bakery product ingredient. *Int J Mol Sci*, **2011**, *12*, 2174–2186.

Roy, S.; Sadhukhan, R.; Ghosh, U.; et al. Interaction studies between biosynthesized silver nanoparticle with calf thymus DNA and cytotoxicity of silver nanoparticles. *Spectrochim Acta Mol Biomol Spectrosc*, **2015**, *141*, 176–184.

Ryan, R. P.; Vorholter, F.; Potnis, N.; et al. Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium-plant interactions. *Nature Rev Microbiol*, **2011**, *9*, 344–355.

Rygula, A.; Majzner, K.; Marzec, K.; et al. Raman spectroscopy of proteins: a review. *J Raman Spectrosc*, **2013**, *44*, 1061-1076.

Saenz, C.; Estevez, A. M. Utilización de residuos de la industria de jugos de naranja como fuente de fibra dietética en la elaboración de alimentos. *Arch Latinoam Nutr*, **2007**, *57*, 186-191.

Sanches, A. L.; Miranda, S.; Junior, J.; et al. Análise econômica da prevenção e controle do cancro cítrico no Estado de São Paulo. *RESR*, **2014**, *52*, 549-566.

Sanghi, R.; Verma, P. Biomimetic synthesis and characterisation of protein capped silver nanoparticles. *Bioresourc Technol*, **2009**, *100*, 501–504.

Schwartz, A. J.; Kumar, M.; Adams, B.; et al. *Electron Backscatter Diffraction in Materials Science*. New York: Springer, **2000**.

Silva, A.; Ferro, J.; Reinach, F. C.; et al. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature*, **2002**, *417*, 459-463.

Singh, G.; Stephan, C.; Westerhoff, P.; et al. Measurement methods to detect, characterize, and quantify engineered nanomaterials in foods. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, **2014**, *13*, 693-704.

Siwach, O.; Sen, P. Fluorescence properties of Ag nanoparticles in water, methanol and hexane. *J Lumin*, **2009**, *129*, 6–11.

Siwach, O.; Sen, P. Synthesis and fluorescence properties of Ag nanoparticles. *Solid State Commun*, **2008**, *148*, 221–225.

Simberg, D.; Park, J.; Karmali, P.; et al. Differential proteomics analysis of the surface heterogeneity of dextran iron oxide nanoparticles and the implications for their in vivo clearance. *Biomaterials*, **2009**, *30*, 3926–3933.

Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J.; et al. *Fundamentos de Química Analítica*. São Paulo: Cengage Learning, **2006**.

Slade, D.; Ferreira, D.; Marais, J. Circular dichroism, a powerful tool for the assessment of absolute configuration of flavonoids. *Phytochemistry*, **2005**, *66*, 2177–2215.

Slocik, J.; Govorov, A.; Naik, R. Plasmonic circular dichroism of peptide-functionalized gold nanoparticles. *Nano Lett*, **2011**, *11*, 701–705.

Soliveri, G.; Ardizzzone, S.; Yüksel, S.; et al. Microwave-Assisted silver nanoparticle film formation for SERS applications. *J Phys Chem C*, **2016**, *120*, 1237–1244.

Sondi, I.; Goia, D. V.; Matijevic, E. Preparation of highly concentrated stable dispersions of uniform silver nanoparticles. *J Colloid Interface Sci*, **2003**, *260*, 75–81.

Sondi, I.; Salopej-Sondi, B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *J Colloid Interface Sci*, **2004**, *275*, 177–182.

Sprecher, C. A.; Baase, W. A.; Johnson Jr., W. Conformation and circular dichroism of DNA. *Biopolymers*, **1979**, *18*, 1009–1019.

Stalin Dhas, T.; Kumar, V. G.; Karthick, V.; et al. Facile synthesis of silver chloride nanoparticles using marine alga and its antibacterial efficacy. *Spectrochim Acta Mol Biomol Spectrosc*, **2014**, *120*, 416–420.

Stamplecoskie, K.; Scaiano, J. Optimal size of silver nanoparticles for Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *J Phys Chem*, **2011**, *115*, 1403–1409.

Sun, X. -F.; Qin, J.; Xia, P. -F.; et al. Graphene oxide–silver nanoparticle membrane for biofouling control and water purification. *Chem Eng J*, **2015**, *281*, 53–59.

Tasic, L.; Borin, P. F.; Khater, L.; et al. Cloning and characterization of three hypothetical secretion chaperone proteins from *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Protein Express Purif*, **2007**, *53*, 363–369.

Tasic, L.; Mandic, B.; Barros, C.; et al. Exploring bioactivity of hesperidin, naturally occurring flavanone glycoside, isolated from oranges. Em S. Simons, *Citrus Fruits* (pp. 76-88). New York: Nova Publishers, **2016**.

Tasic, L; Tsukamoto, J; Awan, A T; Durán, N. PROCESSO DE OBTENÇÃO DE BIOETANOL, ESPERIDINA E NANOCELULOSE A PARTIR DE BAGAÇO DE LARANJA Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020130325856, data de depósito: 18/12/2013.

Trinh, N. D.; Nguyen, T. T. B.; Nguyen, T. H. Preparation and characterization of silver chloride nanoparticles as an antibacterial agent. *Adv Nat Sci Nanosci Nanotechnol*, **2015**, 6, 1-6.

Valverde-Alva, M. A.; García-Fernández, T.; Villagrán-Muniz, M.; et al. Synthesis of silver nanoparticles with different shapes. *Appl Surf Sci*, **2015**, 355, 341–349.

Vayá, I.; Gustavsson, T.; Miannay, F. A.; et al. Fluorescence of natural DNA: from the femtosecond to the nanosecond time scales. *J Am Chem Soc*, **2010**, 132, 11834–11835.

Vernon-Parry, K. D. Scanning Electron Microscopy: an introduction. *III-Vs Review*, **2000**, 13, 40-44.

Verwey, E. J.; Overbeek, J. T. *Theory of the Stability of Lyophobic Colloids*. Amsterdam: Elsevier, **1948**.

Vivian, J.; Callis, P. Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins. *Biophys J*, **2001**, 80, 2093–2109.

Vojnov, A. A.; Amaral, A. M.; Dow, J. M. Bacteria causing important diseases of citrus utilise distinct modes of pathogenesis to attack a common host. *Appl Microbiol Biotechnol*, **2010**, 87, 467–477.

Wigginton, N. S.; De Titta, A.; Piccapietra, F.; et al. Binding of silver nanoparticles to bacterial proteins depends on surface modifications and inhibits enzymatic activity. *Environ Sci Technol*, **2010**, 44, 2163–2168.

Williams, D. B.; Barry Carter, B. *Transmission Electron Microscopy*. New York: Springer, **1996**.

Xiu, Z. M.; Zang, Q. B.; Puppala, H. L.; et al. Negligible particle-specific antibacterial activity of silver nanoparticles. *Nano Lett*, **2012**, 12, 4271–4275.

Yang, J.; Kalhan, S. C.; Hanson, R. W. What is the metabolic role of phosphoenolpyruvate carboxykinase? *J Biolol Chem*, **2009**, 284, 27025-27029.

Zhang, H.; Jung, J.; Zhao, Y. Preparation and characterization of cellulose nanocrystals films incorporated with essential oil loaded  $\beta$ -chitosan beads. *Food Hydrocoll*, **2017**, 69, 164-172.

Zhang, L.; Liu, H.; Shao, Y.; et al. Selective lighting up of epiberberine alkaloid fluorescence by fluorophore-switching aptamer and stoichiometric targeting of human telomeric DNA G-quadruplex multimer. *Anal Chem*, **2015**, 87, 730–737.

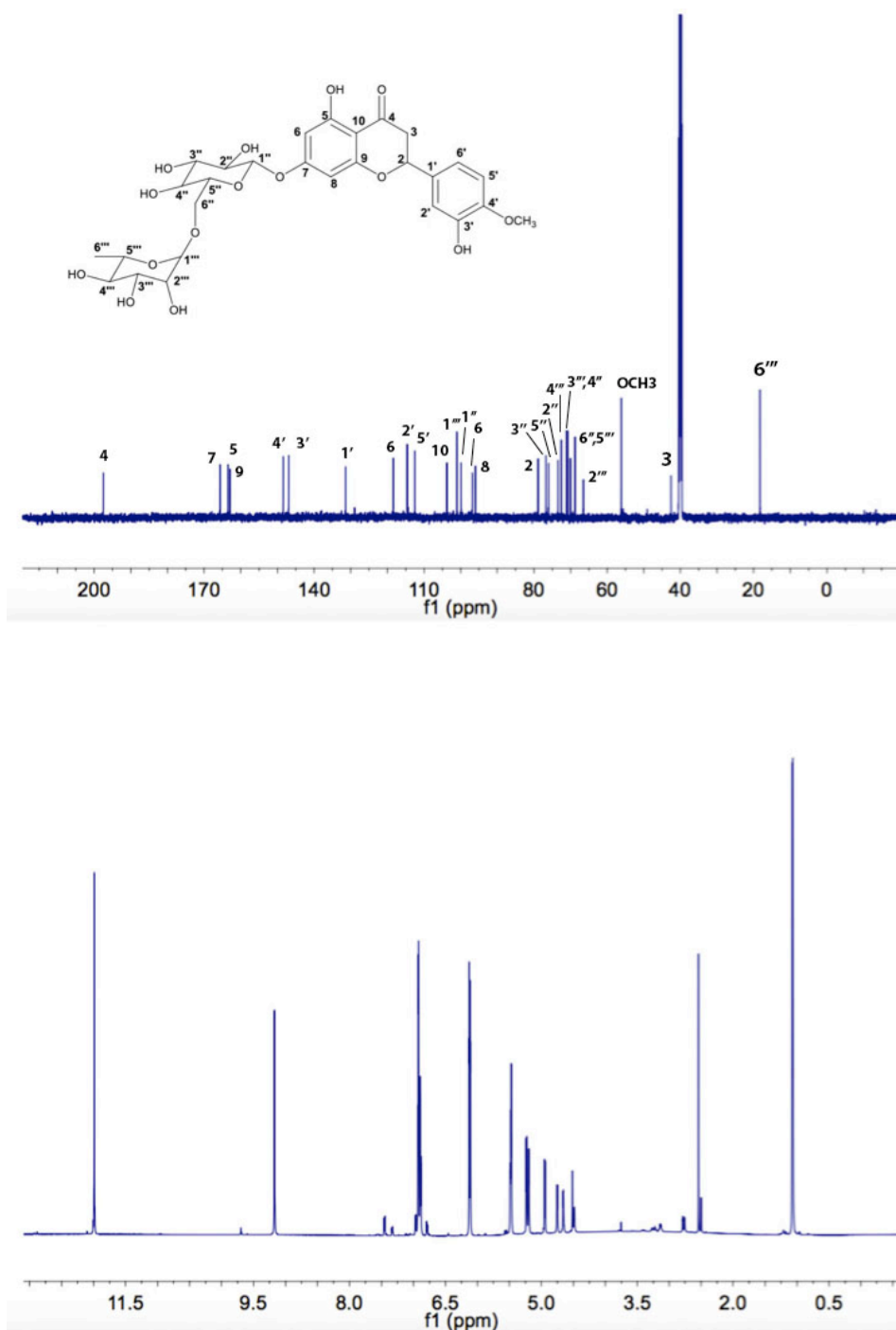
Zhou, S.; Li, J.; Gilroy, K. D.; et al. Facile synthesis of silver nanocubes with sharp corners and edges in an aqueous solution. *ACS Nano*, **2016**, 10, 9861–9870.

Zhou, W.; Wang, Z. L. *Scanning Microscopy for Nanotechnology*. New York: Springer, **2007**.

Zimaro, T.; Thomas, L.; Marondedze, C.; et al. Insights into *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* biofilm through proteomics. *BMC Microbiology*, **2013**, 13, 186-200.

## APÊNDICE 1

Abaixo encontram-se os espectros de  $^1\text{H}$  RMN e  $^{13}\text{C}$  RMN da hesperidina extraída de resíduos de laranja, com a devida atribuição.



**Figura A1.** Espectro de  $^1\text{H}$  RMN (abaixo) e  $^{13}\text{C}$  RMN (acima) da hesperidina, feito em DMSO- $d_6$  em equipamento Bruker Avance 600 MHz.



**Atribuição:**

$^1\text{H}$  RMN: (DMSO- $d_6$ , 600 MHz):  $\delta$  1,1 (d, 3H,  $J=6,0$  Hz, H-6'''), 3,3 (m, 1H, H-3''') 3,2 (d, 1H, H-3), 3,2 (m, 2H,  $J=17,0$ , 11,0 Hz, H-4'', H-4'''), 3,2 (m, 1H, H-2'''), 3,4 (m, 3H, H-6'', H-3'''), 3,4 (m, 1H,  $J=$  Hz, H-5'''), 3,5 (m, 1H, H-5''), 3,6 (m, 1H, H-2''), 3,8 (s, 3H, 4'-OCH<sub>3</sub>), 4,5 (d, 1H,  $J=6,3$  Hz, H-1'''), 5,4 (d, 1H, H-1), 5,5 (dd, 1H, H-2), 6,1 (d, 1H, H-6), 6,1 (d, 1H, H-8), 6,9 (m, 3H, H-2',6',5'), 9,1 (s, 1H, OH-3'), 12,0 (s, 1H, OH-5).

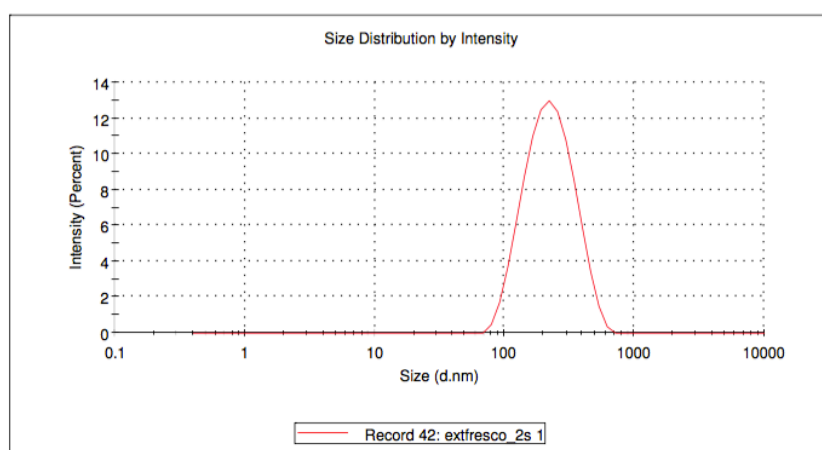
$^{13}\text{C}$  RMN: (DMSO- $d_6$ , 150 MHz):  $\delta$  18,3 (C6'''), 42,5 (C3), 56,2 (OCH<sub>3</sub>), 66,5 (C2'''), 68,8 (C6''), 68,9 (C5'''), 70,1 (C3'''), 71,2 (C4''), 72,5 (C4'''), 73,5 (C2''), 76,0 (C5''), 76,7 (C3''), 78,9 (C2), 96,0 (C8), 96,9 (C6), 99,8 (C1''), 101,1 (C1'''), 103,8 (C10), 112,5 (C5'), 114,7 (C2'), 118,4 (C6), 131,5 (C1'), 146,9 (C3'), 148,4 (C4'), 162,9 (C9), 163,7 (C5), 165,7 (C7), 197,6 (C4).

## APÊNDICE 2

Abaixo encontram-se os gráficos de distribuição de tamanho e de potencial zeta para cada um dos tipos de nanopartículas produzidos (é mostrada uma medida de três obtidas para cada tipo de nanopartícula).

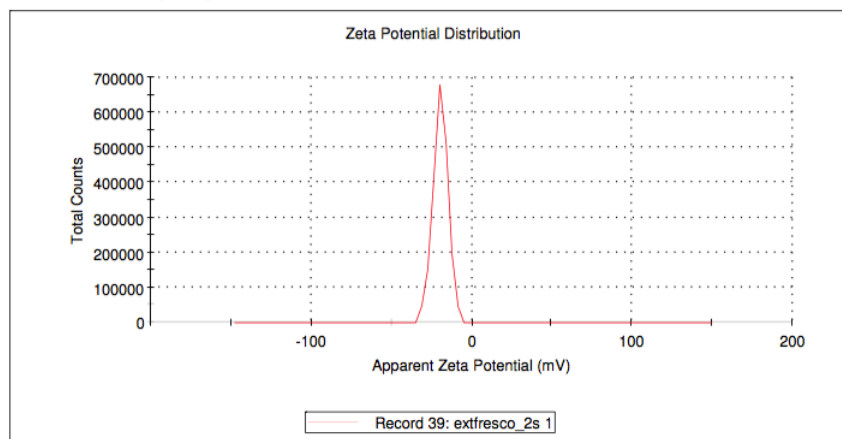
### Results

	Size (d.nm...)	% Intensity:	St Dev (d.n...
<b>Z-Average (d.nm):</b> 167,9	<b>Peak 1:</b> 237,7	100,0	99,70
<b>Pdl:</b> 0,292	<b>Peak 2:</b> 0,000	0,0	0,000
<b>Intercept:</b> 0,866	<b>Peak 3:</b> 0,000	0,0	0,000
<b>Result quality</b> Good			



### Results

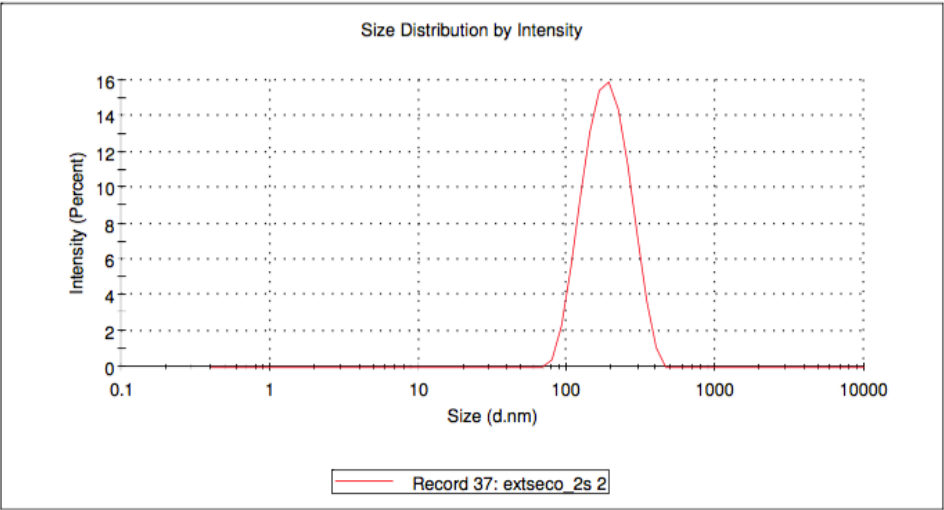
	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
<b>Zeta Potential (mV):</b> -19,5	<b>Peak 1:</b> -19,5	100,0	4,66
<b>Zeta Deviation (mV):</b> 4,66	<b>Peak 2:</b> 0,00	0,0	0,00
<b>Conductivity (mS/cm):</b> 0,153	<b>Peak 3:</b> 0,00	0,0	0,00
<b>Result quality</b> Good			



**Figura A2.** Medidas de diâmetro hidrodinâmico (acima) e potencial zeta para AgNP 1.

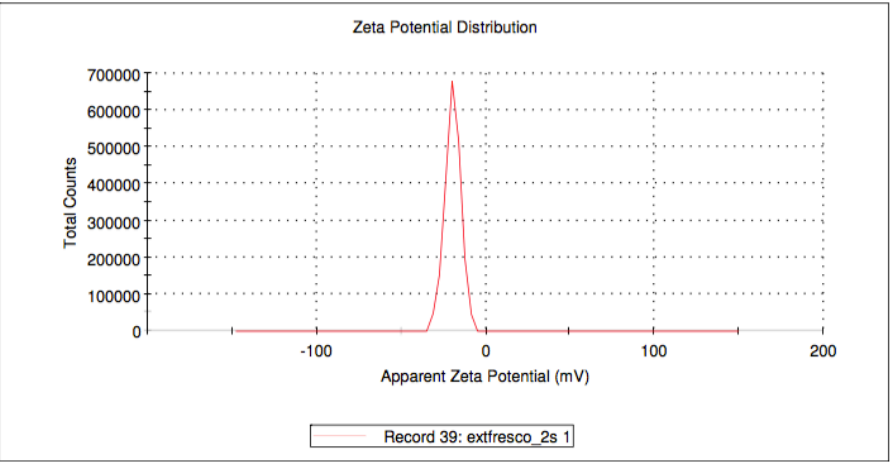
Results

	Size (d.nm...	% Intensity:	St Dev (d.n...
<b>Z-Average (d.nm):</b> 159,9	<b>Peak 1:</b> 193,3	100,0	65,20
<b>Pdl:</b> 0,186	<b>Peak 2:</b> 0,000	0,0	0,000
<b>Intercept:</b> 0,884	<b>Peak 3:</b> 0,000	0,0	0,000
<b>Result quality</b> Good			



Results

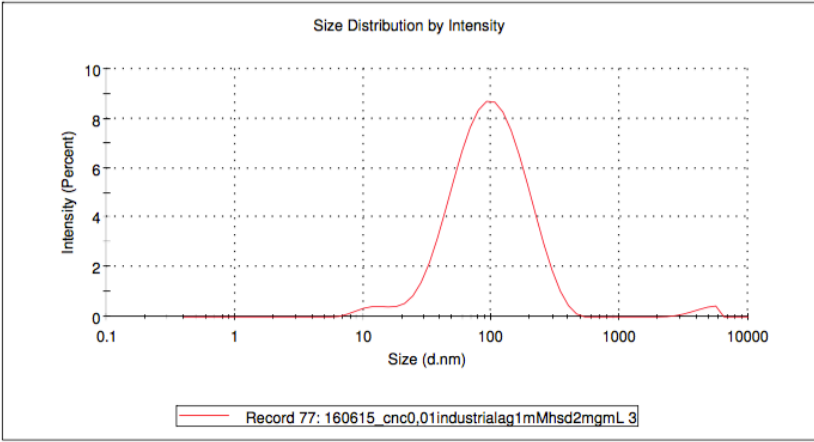
	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
<b>Zeta Potential (mV):</b> -19,5	<b>Peak 1:</b> -19,5	100,0	4,66
<b>Zeta Deviation (mV):</b> 4,66	<b>Peak 2:</b> 0,00	0,0	0,00
<b>Conductivity (mS/cm):</b> 0,153	<b>Peak 3:</b> 0,00	0,0	0,00
<b>Result quality</b> Good			



**Figura A3.** Medidas de diâmetro hidrodinâmico (acima) e potencial zeta para AgNP 2.

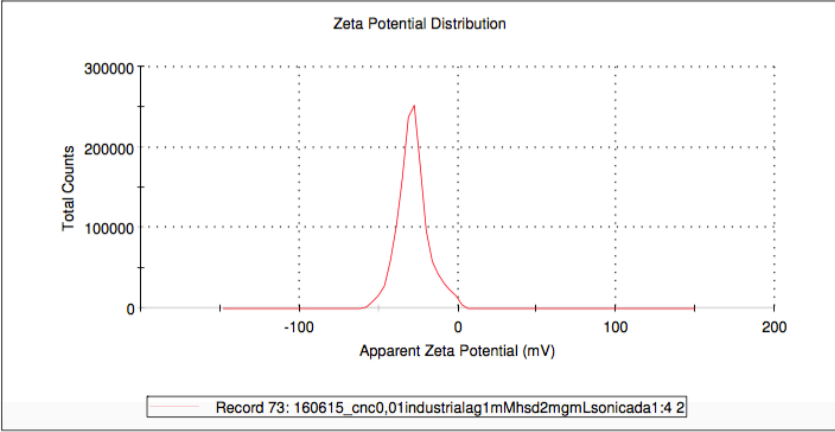
Results

	Size (d.nm...	% Intensity:	St Dev (d.n...
<b>Z-Average (d.nm):</b> 79,38	<b>Peak 1:</b> 113,3	96,6	70,57
<b>Pdl:</b> 0,288	<b>Peak 2:</b> 12,00	1,9	2,589
<b>Intercept:</b> 0,811	<b>Peak 3:</b> 4523	1,5	868,0
<b>Result quality</b> Good			



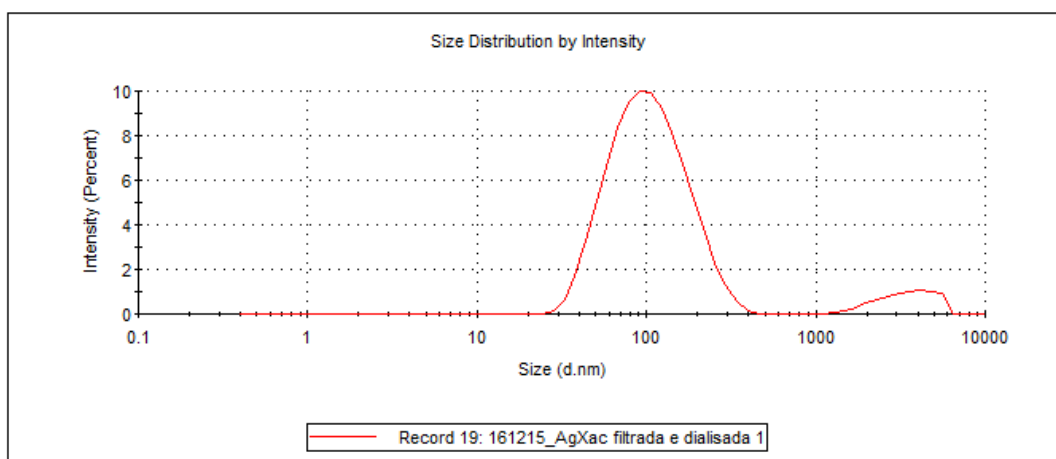
Results

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
<b>Zeta Potential (mV):</b> -28,3	<b>Peak 1:</b> -28,3	100,0	9,82
<b>Zeta Deviation (mV):</b> 9,82	<b>Peak 2:</b> 0,00	0,0	0,00
<b>Conductivity (mS/cm):</b> 0,00894	<b>Peak 3:</b> 0,00	0,0	0,00
<b>Result quality</b> Good			

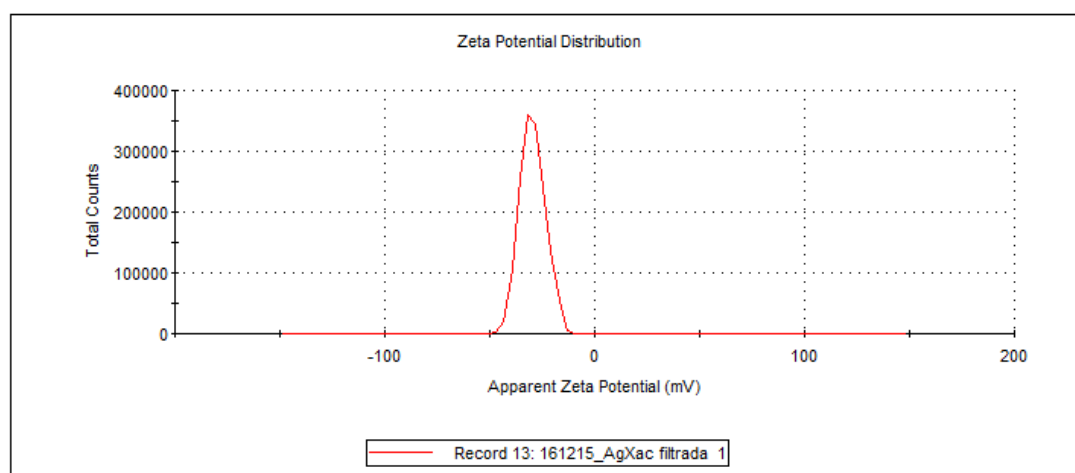


**Figura A4.** Medidas de diâmetro hidrodinâmico (acima) e potencial zeta para AgNP 3.

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
<b>Z-Average (d.nm):</b> 95,48	<b>Peak 1:</b> 113,9	92,5	59,64
<b>Pdl:</b> 0,320	<b>Peak 2:</b> 3556	7,5	1215
<b>Intercept:</b> 0,891	<b>Peak 3:</b> 0,000	0,0	0,000
<b>Result quality :</b> Good			



	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
<b>Zeta Potential (mV):</b> -29,6	<b>Peak 1:</b> -29,6	100,0	5,96
<b>Zeta Deviation (mV):</b> 5,96	<b>Peak 2:</b> 0,00	0,0	0,00
<b>Conductivity (mS/cm):</b> 0,116	<b>Peak 3:</b> 0,00	0,0	0,00
<b>Result quality :</b> Good			

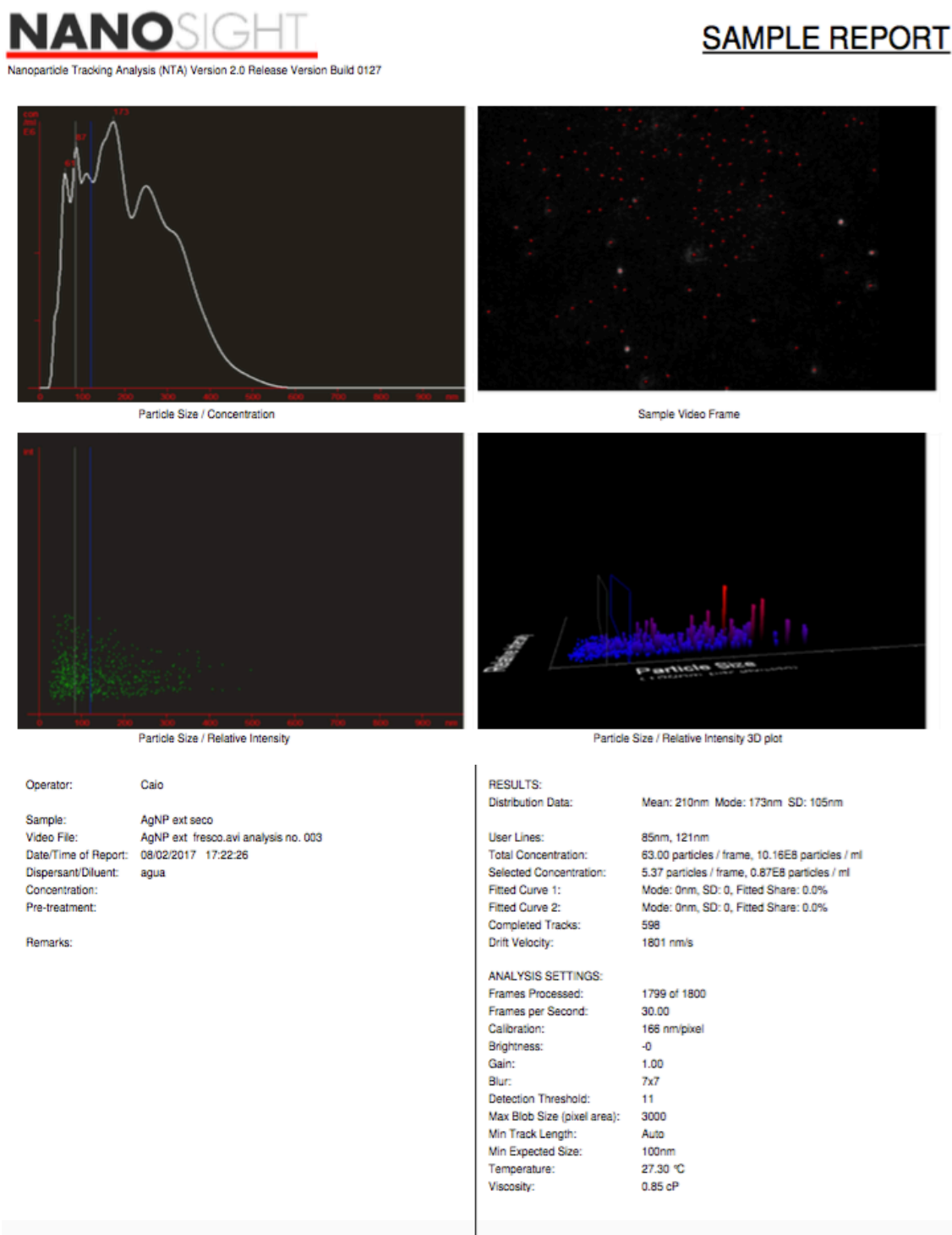


**Figura A5.** Medidas de diâmetro hidrodinâmico (acima) e potencial zeta para AgCl NP.

## APÊNDICE 3

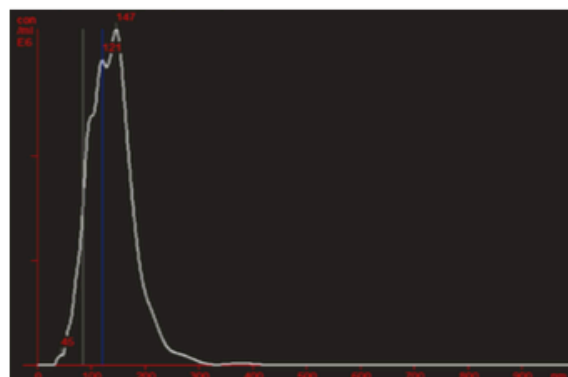
Abaixo são apresentados os relatórios das análises de Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) para as AgNPs produzidas.

AgNP 1:

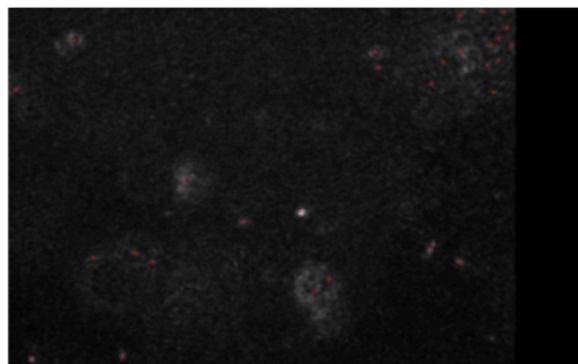


**Figura A6.** Relatório de análise NTA da AgNP 1.

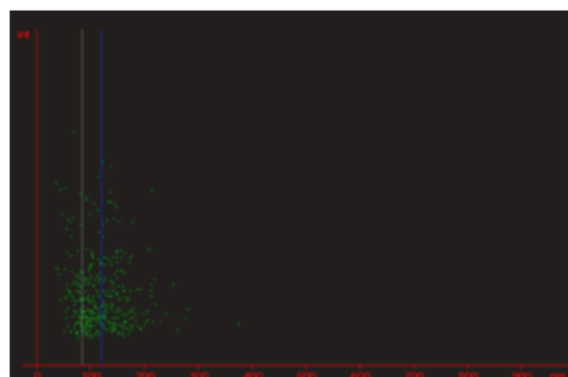
## SAMPLE REPORT



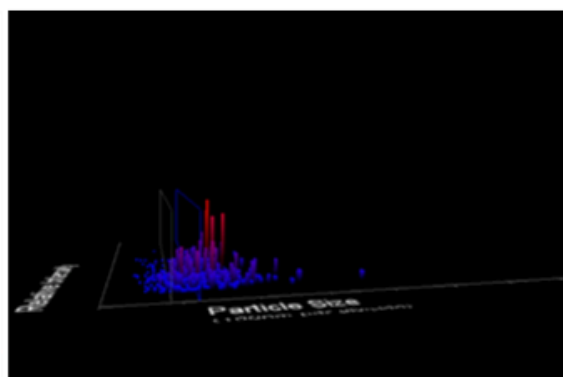
Particle Size / Concentration



### Sample Video Frame



Particle Size / Relative Intensity



Particle Size / Relative Intensity 3D plot

Operator: Caio

Sample: AgNP ext seco

Video File: AgNP ext seco 3.avi analysis no. 002

Date/Time of Report: 08/02/2017 17:12:16

Dispersant/Diluent: agua

Concentration:

Pre-treatment:

Remarks:

**RESULTS:**  
Distribution Data: Mean: 139nm Mode: 147nm SD: 44nm  
  
User Lines: 85nm, 121nm  
Total Concentration: 19.48 particles / frame, 3.14E8 particles / ml  
Selected Concentration: 4.14 particles / frame, 0.67E8 particles / ml  
Fitted Curve 1: Mode: 0nm, SD: 0, Fitted Share: 0.0%  
Fitted Curve 2: Mode: 0nm, SD: 0, Fitted Share: 0.0%  
Completed Tracks: 396  
Drift Velocity: 1875 nm/s

ANALYSIS SETTINGS:

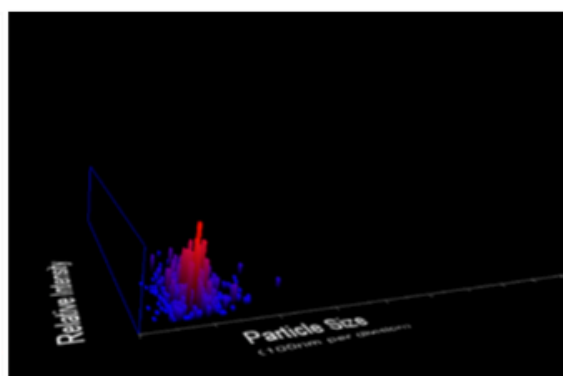
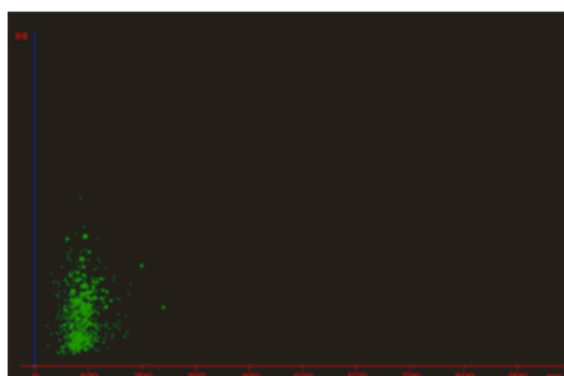
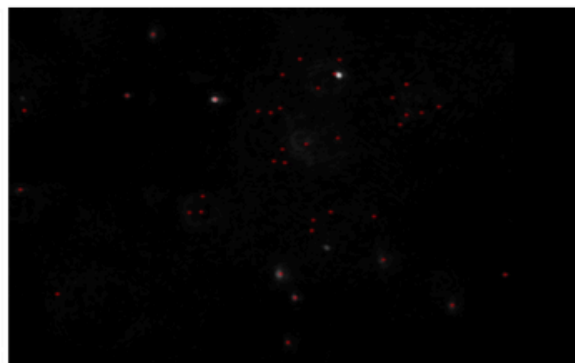
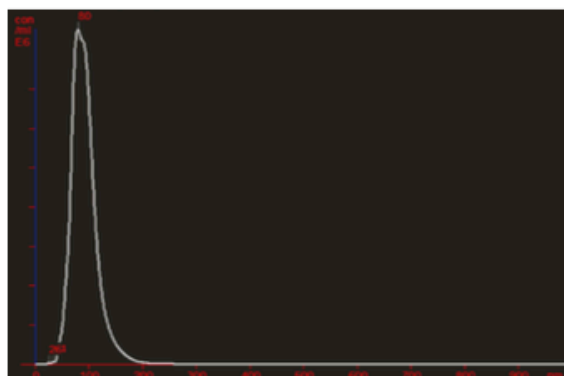
Frames Processed:	1799 of 1800
Frames per Second:	30.00
Calibration:	168 nm/pixel
Brightness:	-0
Gain:	1.00
Blur:	7x7
Detection Threshold:	40
Max Blob Size (pixel area):	3000
Min Track Length:	Auto
Min Expected Size:	100nm
Temperature:	27.30 °C
Viscosity:	0.85 cP

**Figura A7.** Relatório de análise NTA da AgNP 2.

# NANOSIGHT

Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) Version 2.0 Release Version Build 0127

## SAMPLE REPORT



Operator: Caio  
 Sample: AgNP hsd nc  
 Video File: AgNP hsd nc.avi analysis no. 003  
 Date/Time of Report: 08/02/2017 16:53:17  
 Dispersant/Diluent: agua  
 Concentration:  
 Pre-treatment:  
 Remarks:  
 sem lavagem

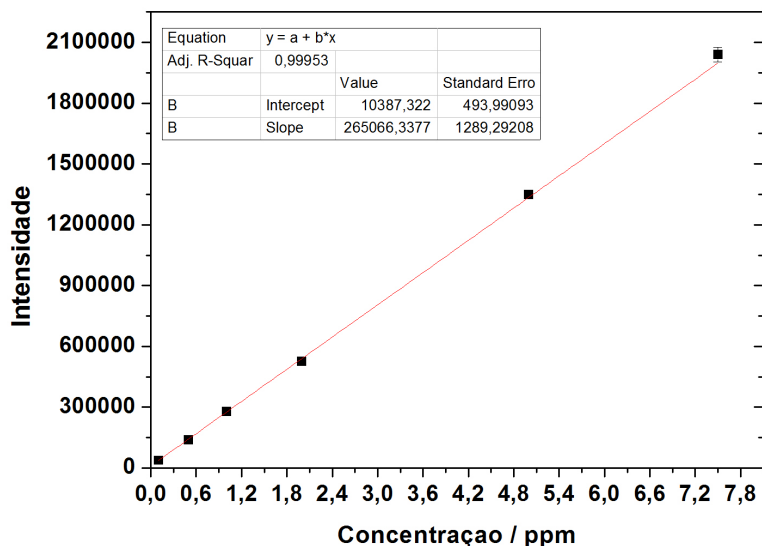
RESULTS:  
 Distribution Data: Mean: 92nm Mode: 80nm SD: 25nm  
 User Lines: 0nm, 0nm  
 Total Concentration: 27.38 particles / frame, 4.41E8 particles / ml  
 Selected Concentration: 0.00 particles / frame, 0.00E8 particles / ml  
 Fitted Curve 1: Mode: 0nm, SD: 0, Fitted Share: 0.0%  
 Fitted Curve 2: Mode: 0nm, SD: 0, Fitted Share: 0.0%  
 Completed Tracks: 774  
 Drift Velocity: 6435 nm/s  
 ANALYSIS SETTINGS:  
 Frames Processed: 1799 of 1800  
 Frames per Second: 30.00  
 Calibration: 166 nm/pixel  
 Brightness: -0  
 Gain: 1.00  
 Blur: 3x3  
 Detection Threshold: 9  
 Max Blob Size (pixel area): 3000  
 Min Track Length: Auto  
 Min Expected Size: 100nm  
 Temperature: 28.00 °C  
 Viscosity: 0.83 cP

**Figura A8.** Relatório de análise NTA da AgNP 3.



## APÊNDICE 4

Abaixo encontra-se a curva de calibração utilizada para as medidas de ICP-OES e a tabela com os dados de cada AgNP analisada.



**Figura A9.** Curva de calibração de prata utilizando equipamento de ICP-OES.

**Tabela A1.** Dados de concentrações de prata das amostras analisadas por ICP-OES

	AgNP 1		AgNP 2		AgNP 3	
Concentração (20x diluída) (ppm)	Não lavada	Lavada	Não lavada	Lavada	Não lavada	Lavada
1	2,69	2,27	2,95	1,40	1,43	1,38
2	2,98	2,36	2,95	1,41	1,44	1,48
3	2,71	2,30	2,95	1,42	1,47	1,47
Média	2,79	2,31	2,95	1,41	1,45	1,44
Estimativa do desvio padrão	0,16	0,05	0,00	0,01	0,02	0,05
Rendimento (%)	83		48		99	

## APÊNDICE 5

Na tabela A2 encontram-se alinhamentos entre peptídeos com íon score acima de 10 e proteínas do gênero *Citrus*, feito pelo servidor Protein BLAST (NCBI).

**Tabela A2.** Proteínas identificadas pela ferramenta BLAST com peptídeos com score acima de 10.

PROTEÍNAS DO EXTRATO DE CASCA FRESCA						
Proteína identificada	Código NCBI	Ion Score (MASCOT)	Total Score (BLAST)	pl teórico	Massa (kDa)	Sequência (peptídeos identificados em vermelho)
Predita: DNA polimerase épsilon subunidade catalítica tipo A [Citrus sinensis]	XP_006471371.1	29	50,5	6,25	253,832	MDRRRWDRQDGRRTKKQKLIRSAEEEELEAKLGYDLFSEGDKRL GWLITFASSSLEDEDTRKVYSCIDLYFVSQDGSFVKSKYKFRP YFYAATKEKMEMDVEAYLRRRYESQIADIEILEKEDLDLKNHL SGLHKSYLKISFDTVQQLMDVKKDLLQVVERNQAKFDAEAYE SILTGKREQRPQDFLDCIVDLREYDVPYHIRFAIDNDVRCGQW YDVSVSSTGPLEKRVDLLQRAEVHVCAFDIETTKLPLKFPDA DYDIIMMISYMLDGQGYLIINRECVGEDIEDLEYTPKPEFEGY FKVTNVNNEIELLRLWFAHMQEVKPGIYVTYNGDYFDWPFLET RAAHGFGKMSEELGFCQDKNQGECAKFAHLDCFAWVKRDSY LPQGSQGLKAVTKAKLGYPLEVPEDMVRFAKEKPQMMAYS VSDAVATYYLYMTYVHPFIFSLATIIPMSPDEVLRKGSGLTCE MLLMVQAYKANVICPNKHQSDPEKFYRNHLLSEITYIGGHVEC LESGVFRSDLPTSFKLDPSAYEQLLNNLDRDLQYAIKVEGKMD LESVSNYDEVKNAIMEKLLRLQEEPIREECPLIYHLDVAAMYP NIILTNRLQPPSIVTDEVCTACDFNRPGKTCLRKLEWVWRGEI FMGKRSDYYHLKKQIESEFVDGTNGHLSKSFLDLPKMEQQSRL KDRLKKYCQKAYKRVLDKPVTELREAGICMRENSFYVDTVRSF RDRRYEYKGLNKVWKGKLSAKASGNSIKIQEAQDMVLYDSL QLAHKCILNSFYGYVMRKGARWYSMEMAGVVTYTGAIIQNAR LLIEKIGKPLELDTDGIWCVLPGSFPENFTFKTKDLKKKLTI YPCVMLNVDVARNTNDQYQTLVDPVSKTYETHSECSIEFEVD GPYKAMILPASKEEGILIKKRYAVFNDDGTLAELKGFEIKRRG ELKLIKVFQAEFLDKFLHGSTIEECYSAVAANRWLDLLDNQ GKDIADSELIDYISESSTMSKSLADYGEQKSCAVTTARRLSDF LGDTMVKDKGLRCQYIVACEPQGTPVSERAVPVAIFETDAEIM KFYLRKWCKTSSDVGIRSIVDWSYKQRLSSAIQK <b>ITIPAA</b> <b>QK</b> VSNPVPVRVHPDWLYKKVREKEDKFRQRKLVDIFSSLLKKDD FLNKTCNAETNLMDENVEDLEDFPKKRRN SVNGPRPIVRCFEVNNEQKTVKTTDQVDSLQQLEPSEVSDQQ PSSQNAIDTENIDRIVDYKGWLELKKRWKDNLDLRRKKQKLGS LRASHQANGVSESLGDMINHKEAQRRTGVGSYFRRQETAMTRC HWQIIQLVPSSQSGVFLAWVVVEGIMVRIPITVPRLFYLNSKD PIVEKFPGRRVNKTLPHGRRSFNLIEMIDEDQFRKESKKLAA LLADPEVEGIYETKVPPEFNAILQIGCVCKVDKSTKKRNTQDG WNLSELHMKTTAECPYLEQSVSFFLYHSISDVRAIYIGYFPT SRTVTVVVSPHQHRELSPSILEKQFREACRTLSTELPPGVRI TFKVEYVGYVKDAEKILQRAISEYRHEHYGPTVAVIECPNSHS LRLGLRVLNDFPCVSIPPNARDSKYQVLGWQQNAAKIGMQRCA ASSQWFNERISLARYAHVPLGNFEPDWLMFTADVFFSRALHDQ

Predita:  
Proteína  
homóloga  
associada  
à tireóide  
adenoma  
[Citrus  
sinensis]

XP\_00  
64825  
71.1

21

69,8

5,92

249,466

QQILWISDDGVPDLGGTSEEDECFADDEVHQPVLTYPGAYRKVS  
VELKIHHLVSNALLKSNQVNEGGLFGFDQDMNSGPYNNEL  
CGFDETTSSAPAFRVLKQLIQRCCLTDAVTSGNVFADAILQHLY  
RWLCSPHSLKLDLHRLHILHKVMQKVFAMLLAEFRKLGAIIIF  
ANFSKVIIDTGKFDLSAAKAYCDSLLKALQTRELFIEWIELEPV  
HFWHSLLFMDQYNYGGIPARADESLDDDSQVDIVSSWNIAEYL  
PKEIQDHFVLVVSEFMYIPWKHAQKLAASRASLQEGSSCTPSI  
TVAAAENFESHIVQYVKGEISSYFTGKLLSIVRDAIHHMKMN  
NDQHNSPGVMQTAANIHKVDAPLEFIKHVCAAFALDQNVQHDV  
LVMRKNLLKYVRVREFAPEAEFRDPCPSFILPNVICSYCNDRCR  
DLDLCRDMALLAQDWHCAMPQCGQPYDREVMENALLQIVRQRE  
RLYHLQDLVCIRCNOVKAAHLAEQCACAGSFRCKEDASDFRSM  
MQIFLNIANRQGFQLLQECTSWILEVQ

MSAKWRALQHRHRYTYSVVFPSTSLTESLTQIPSSQNSSFSKF  
HNAFRELVSLSIYAQVNHAKKFASSFIELLSANAAADEWVL  
SKATRVYLEVMFLENSLPLHRTLVSALAKERKFQALIVSCFRD  
LCDEYGGGGRASDQNKRCVSRVLSVMSLPKLGYLMDVIQDC  
AVLVAVDVLGLNGVVLETQEWARPSPIVMEQCQEALSCLYYL  
LQRCCLKFKGLSGQKESIMEMIFVVLISILKSTAFSRDCYVAA  
GVALCAALQVCLGPQELGLFLIEGIFYQKTCFSSEKSKSEFE  
DALQVCFRKTPFNGDVCSEIHNFSVLSRLCLIRGILTAVSRNV  
LNALFFVSKEDLSNGSENGDSDAKTILYNGILPELCSYCENPT  
DSHFNFHALTVLQICLQKIKTSILANLTNVSFDYDPIPEDMGT  
RILRIIWNNEDEPLSQTVKQVHLVFDLFLDISSLRWVGSER  
IKSFLQKIASDLLCLGPRCKGRYVPLALLTKRLGAKTLLGMSP  
DLLSEIVNAYIDDDVCSAATSFLKCFLECLRDECWSSNGISRG  
YAVYRGHCLPPFLYGLASGVSKLRSNLNTYALPVLLDMDVDGI  
FPMLAFVSVVPSEEENGLSYPELDCSSIELKVEQQVAVFVSLL  
KVSRSLALAEGLDIDLWKNSSVLRGTGSKFVTEGSNLYALVCIKG  
INFKVLVDWLVLALTHADELLRVDAAESLFLNPKTASLPSHLE  
LTLMEKAVPLNMRSCSTAFQMKWTSFRKFFSRVRTALERQFK  
QGSWRPVVSCENS DRTLINGTDTVISKAENLFKFMRLWSCFLF  
FSCYPSAPYKRKIMAMELILTMNIWSIAPPQEKLDVSLESS  
LYPYNGKITAPNSTLLLVGSIIDSWDRLRESSFRILLHFPSP  
PGISSEGVMQKVTWSSKKLVCSPRVRES DAGALALRLIFRKYV  
LDLGWIVRASVNVVCLHPQPQQLKGEGQICKSSAPVVEYIKSL  
IDWLEVAVKEGERDLSESCENSFVHGILLALRYTFEELDWN  
AVLSGYSEMKALEKLELVMRITSLALWVVSADAWCLPEDMD  
DMIIDNLLLDVPEEMDEPLRSLEDEEKNKPAQDVRTSEQVV  
MVG CWLAMKEVSLLLGTIIRKIPLPINSSSDTVDSGSGTSDAA  
DDLMTMSDAMLDLKQLEKIGNHFLEVLL  
KMKHNGAIDKTRAGFTALCNRLCSNDLRLCRLTESWMEQLME  
RTVAKGQIVDDLRRSAGIPAAFIALFLAEPEGAPKKLLPQAL  
RWLIDVANRSLDLIENKGAKTMCESHSNQETESAVPPDIY  
ATWNSSKIRDEGVVPTVHAFNILRAAFNDTNLAADTSAFSAEA  
LIISIRSFSSPYWEIRNSACLAYTALIRMLGFLNVQKRESAR  
RALTGLEFFHRYPSLHPFIFNELRVITELLGNASSGQSASNLA  
NVVHPSLCPMLILLCRLKPSALAGESGDDLDPFLFMPFIRRC  
TQSNLKVRVLASRALTGLVPNEKLPDVLLNIASELLCVEDQNE  
AAPVSSLRGTHRASFNLIHGILLQLGSLLDANCRLVDFSKKD  
QILGDLIKILGNCSWIANPKMCPCPILNASFLKVLHDVLSIAR  
TCHTSKSFSTVRNLLLELSTDCLDVDASYGLTYDPTITELRK  
KAANSYFSCVFQASEESGEEVLQLPQRCSPVDSTSSKIPDMEN  
TFSGLLERLVRSLSDSSYEVRSLTLKWLLKFLKSTESDREVCE  
LSSYEIKSIQNWTKNNLQATLMSRLELEKNPRCTNYVLRLLFT

						<p>WNLLQFQKLGSNVCTETIFVGSVDCDSVFQFWDRLMSSYELTR  HAKIKESLINCMIAICIRRFANLFTSSILVDARKKTIEISESDH  LGRSAHLFACITAFVNIINRHSSSSEPVMNRKAATGSIVASGL  LEQADLIGSYVSNHQIPSENSSLHFEPQEAGNMYAHQVFLVIWF  TCIKLLEDEDDGIRQRLAIDVQKCFSLKRFGSSSHGVPNQVEK  VIELSFEHLSSIFGCWIEYFDYLCQWVLVAASHVVSGGDLVRR  VFDKEIDNHHEEKLLISQICCSQLEKIPILKSWVADSLNKDHA  RNYLLGWRQRFHQMSFAKDHRKYEGVDWIGGVGNHKDAFL  PLYANLLGFYALSICIFKVEAEDEMHLSDVVELGRIISPFLR  NPLVGNLYLLVVKLHEKQTGATADHTVEFRADMIWDGFDPYFL  LR</p>
<p>Predita:  Provável  proteína de  resistência  à doença  At5g63020  [Citrus  sinensis]</p>	<p>XP_00  646537  1.1</p>	20	38,4	5,21	102,892	<p>MGNLLSSFLSSPESFRSILSYVGGEAKYVWALQVNLDALQAEI  DKLIRTKDDLLNKVELVEQQQPRARRTNQVKGWLQVRVQETVTK  VVDLQNVDRDQELDRLCLGGFCSKDLASSYYFGKKVVTLTQVI  LLKNERGEIKDIAEMVPEDAAVELALERTVVGQESMLDQVLR  ITDQETNRGIIGLYGTGGVGKTTLKQVNNKFCIEQRQHFDV  VIWGVVSREPDKLQDAIGKRIGLSAESWMDKSLEEKALDIS  NILSRKKFVLLDDIWQPIDLTELGIPQLSLNVSSKVVFTTRS  LDVCGSMEADEKIEVKCLVHDEAWRLFQEKVGEATLRCHSDIL  ELAQTARECCGLPLALKTIGRAMAYKKNPDEWKYATKVLSTS  PEKFSGMEENVFARLKFSDSLPNYIIRSCFLYCSLFPEDYEV  YKGDLDIDYWISEGFVDAFDEGYTIIGDLLRACLLVEVNDNHVK  MHDVIRDMALWIACKIDKEENFLVHAGALLTEAPKIDWEGF  KRISLMENNITSLAIPNCPHLRTLILYRNIRISMITDGGFFQFM  PSLKVLNLGFNIFLNKLPSGLSSLSLEHLDLSFTVIRELPEE  MKALVNLRYLNLEYVYLNRLPLQLLCNFTKLQALRMLGCSNYS  GEEEDRVFFKDAEPFMKELLCLNLDLLSFTFDSWHAFETFLT  FQKLLSCTESLELTCLYTPMSLVNPLAYMKHLKNFLIQNCAF  EELKIENAVEIQNLVQRGFRSLHTVCISDCSRLKELTWLVFAP  NLKNIDVQNCNNMEEIISPGLSEVSEIKERQNFLAELKFLCL  KDLENLESIYFDPLPFPQLK<b>IEVVTGCPKLK</b>KLPLDSTRAMGH  KIVVKGNIWWVELQWEDRVTRQVFSTCFDPMEIVF</p>
<p>Predita:  Provável  receptor  quinase  inativo  At2g26730  [Citrus  sinensis]</p>	<p>XP_01  53846  36.1</p>	20	55,1	7,87	68,470	<p>MRGSKLFLFLEGLICTAILPRLFTGCVGGELSESESFCKFISA  VDSQNVLRIGWNGNLPHPCSYNLKGICNLHATSIVGIRLENM  NLSGIIDAESLCKLRHLRVVSLAKNLIQGRIPNSISNCRRLTY  LNLSSNLLSGAVPLALTKLHLKTLDISNNHFAGTSPDNFKQE  IKYFDKYVVTSSSEINRASTVEARGLEDTPPPSVHNMSEHGE  KRHWFRNWMTIIPLAAGIGLVVLIAYCMGKKSQAQIARDREILK  ALQDSPSKSPPRVMDIEEVVRPEVRRSELVFFVNEKFKLDDL  LEATADLRSTICSSLFMVRLKNSAVYAVKRLKKLQVSMDEFS  QTMROIGNLKHNPILPLVCYNSTNEEKLLVYKYQSNGLSLL  EAYIEGKRDFPWKLRLSIATGIAKGLDFIYQKSNEEKTI PHGN  LKLSNILLNENEDPLISECGYSKFLDPKKTCLFSSNGYTAPK  TVSEQGDVFSFGVILLELLTGKTVEKTGIDLPKWVKAMVREEW  TGEVFDKEVAKAGRQWAFPLLNVALKCVSNSPDDRPTMAEVLE  R<b>IEEVVNGNDER</b>DRDHSNSSFSSMESIPHDSCLLHTVIQENWD  TPRSSY</p>
<p>Predita:  Antígeno  de célula  de  carcinoma</p>	<p>XP_01  53833  84.1</p>	19	53,0	5,03	113,391	<p>MEPKEETLATIPEEEEDGDTVIPDVENNPKPTTKDNSSDSDG  SDSDSDSDSDSDSEDAAKQSMELQTLQYQLSNEPSNYDTHV  QYIKVLR<b>KMGIEIK</b>LRQAREAMNEIFPLTPAMWQEWARDEASI  STGPEALLGVEKIYERGVSDYLSVPLWCDYLFVQYEDPSIRA  FLPDGISKARNLFERAITAAGLHVSEGSNRETKKMEPKEETLA</p>

escamoso reconhecido por células T tipo 3 [Citrus sinensis]							TPEEEEEEDGDTVIPDVENNPKPTTKDNSSDSSDASDSDSDSDS ESEDEAKQSMELQTLQYQLSNEPSNYDTHVQYIKVLRKMGEIE KLRQAREAMNEIFPLTPAMWQEWARDEASISAGPEALLGVEKI YERGVSDYLHMTSIPRPLLLVLQEKEKQVQIRRSIFHRQLSVP LANSATLLAYKSWEVEQGAVLDVESSNLDGDSSNVALAYQKA LEMCNARAHLEEQISRQDLSDSEKFQQYMIYLKYEQSSGDPGR VQLLYERAITDFPVSSDLWLDYTQYLDKTLKGVNVVRDVYSRA TKNCPPWVGELWVRSLLSLERSRASEEEISTVFEKSLLCAFSTF EYLDLFLTRIDGLRRRILFSGEVEGVLDYSLIRETFQRASDY LSEQMKNTDGLRLRYAYWAHLEQSMGKDMVSARGVWERLLKIS GAMLEAWQSYISMEIELGHINEARSYKRCYSKRFTGTGSEDI CHAWLRFEREYGTLEDFDHSVQKVTPRLEELQLFRSQQESKSL PESADQKEHSVKKGTGREKRKSDLNISYEQSPAKRQKNAPQKPK KVHDKEKQQVQNLAEENEGRETQTVVEEQPKEQPIKDAVPGR KGFTDECTAFLSNINLKATYEDLRRFFSDVGGVSSIRILHDKF TGKSRGLAYVDFIDDEHLAAAVAKNKQMFGLGKLSIARSNPKQ RKDSSGERAPTEQAQSHQQTGNAGTSASKESSIETSKQSRGRG DSVQLKGKNTFAVPRNVRLGFPKPKTEEGEDLKPKSNDEF RKMFIKKD
Fator de transcrição MYB [Citrus sinensis]	AMH40 451.1	15	67,4	5,33	37,617		MGRAPCCEKIGLKKGRWTAEEDEILTKYIRANGEGSWRSLPKN AGLLRGCKSCLRLRWINYLRADLK <del>RGNITAE</del> <del>EEEE</del> <del>TI</del> <del>IV</del> KLHSSLG NRWSLIAAQLPGRTDNEIKNYWNSHLSRKTFSTGTPADDPLTS DDLSNNGIKLAGGCKQRKGRTSKVNSSKKHKLALASIGMPKTKR GTISEVLDQQVTADENKSSIGQVSCMASDEFFCGEASSDQASG LCLSKDIESEVLGPYEWLDSEIKRVNSNLNREKASAEDEVKRD QDKMAKSAEKESVFWGSNEDELLYTFDPTMMNCSGFDEEWLDF DWAAGGAECHNQCELRDGDDKLLCWLWDSGNNEGECQ
Predita: Proteína de resistência aumentada à doença [Citrus sinensis]	XP_00 648807 6.1	15	31,2	8,21	84,063		MDNSQITSQGRMEGWLHLIRSNRIGLQYSRKRYFLLDHFLKS FKSVPHSKNEDPVRSAIIDSCIRVTDNGRESIHRKVFFIFTLY NTSNHNDQLKLGASSPEEAAKWIHSLQEAAALKGGPHQGVGDHI GCPNSPWESFRLSGSSRASHTKSIDWTLCSGTHMEQVTADVIA PSPWTIFGCQNGRLRLFKEGKDRGSRGKWDHPAIDMAVGVDGT SEAI FQTLMSLGASRSVWDFCFYRGCVVEHLDGHTDIIHKQLY SDWLPWGMKRRDLLLRYWRREDDGTYVILYHSVFHKKCPQK GSVRACLKSGGYVITPMNHGKKSUVKHLAIDWKCWRSYLQPS SARSITIRMLGRVAALRELFRKQGNYSSEFLSGELTRNMRM HQTDGNMVQMPTEDGNSKENTSEEVDQVSSEHASLVGLNDAAD EFFDVPEPSDYDDSENGWTSDFGPEMNSQDTRHPKISTAAGFV <del>RKLHDLAVQK</del> RGYVDLQGTAKEDNFSCCYGTTLQKDPTCTLPC SWTSTDPTFLIRGKNYLQDRHKVKAKGTLQMVAADWLKSDK REDDLGGRPGGIVQKYAEQGGPEFFFIINIQVPGSTTYSALY YMMTTPVKDAPLLESFINGDDAYRNSRFKLIPYISEGSWIVKQ SVGKACLIGQALEINYFHGKNYLELGVDIGSSSTVARGVVSIV LGYLNVLVIEMAFLIQANTEEEELPEFLLGTCLRNHLDAKAVL LKPSSRLSSSSSQGPVRN
Proteína hipotética CISIN_1g00 11231mg, parcial [Citrus sinensis]	KDO7 7096.1	14	57,9	5,90	64,199		DLWSGSEGGGIKIWPWEAIEKALSLKPEERHTAALIVERSYID LRSHLSVNGFSSILTSIDIKNLLSDHSRAKVWSAGFLSFALWDA RTRELLKVFNIDGQIENRVDMSLLPDFAMEDEFKTKIIVTSSKK DKAQSSFGFFQORSRNAIMGAADAVRRVAAKGGFGDDNRRTEAL TTSIDGMIWTGGANGLLLQWDPNGNRLQDFQYLPFAVQCLCTF GSQIWVGYMNGIVQVLDLEGNLLGGWVAHSSPVIKMAVGAGYI FTLANHGGIRGWNVTSPGPLDSILCKELAGKEFLYTRMENLKI LAGTWNVGQGRASQDALISWLGSASDVGI VVVGVLQEVEMGAG FLAMSAKETVGLGSAVGHWWLDMIGKILDDGSTFERVGSRQ

						LAGLLIADVVRKNLKDYVGDVDVAAPCGFGRAIGNKGAUGLR VRVYDRIMCFVNCHFAAHLEAVNRRNADFHDVYRTMTFCRPSN LCSAAAAGASSVVQMLRSTNPLSGLTVEGVPELSEADMVIFLG DFNYRLDGITYDEARDFISQRCFDWLRERDQLRAEMEAGNVFQ GMREADIKFPPTYKFEKHLAAGLAGTL
Predita: oleosina 18.2 kDa [Citrus sinensis]	XP_00 647026 0.1	14	46,9	9,84	17,149	MAERDRPQPHQLQVHPQOHSKSLIGQGAAGGGPSASKVLAVL AMLPLGGTFLALAGVTLTGTIIIGLCVTTPLFIIFSPVIVPAAI VLALAVTGFLTSGAFGLTALSSLSWVLSILWQKTGSVPESADQ AKKRVRAGIADYVGQKTKEVGQDIQSKVHEAGGKTGR
Predita: Proteína não- caracterizada a LOC102613 021 isoforma X1 [Citrus sinensis]	XP_00 646810 9.1	13	34,6	8,69	267,261	MTDKNPSRRELLDRWRGIEEEEEELDDGNDPLKRRRIDGLKEKW FADAFNFLIGLPEKNHIWCGSWDIMGPYLELFYNYFKDECHDS PLRLLWKRISGEMQHCICQVSQHHQAQEMYSMEYESGVIGPLL DVLRLSDEERVTKYLREINARLAHQEYYPQIDNNQVICIMYEV LMFPVLLDDQSLFTEFETFIEAVDNMHELALDGHQLFPGVFAL FFFNRRVRTIGRRLARSMGKLRRATDLEPMQPLLKKFIGFLET EVLSTSTFKTSRPRARLKRLPIWLGITSLLFLEPPALEEGILE RYPIFFDVTNLHISGDSPEFSHAVSCLRELKMLGYKLWLRST LSPSVMRNTLLGQCFHTRSEKIHKIDFDLFPFLOSLEALQDG EHEKQRRHFLYFLLYQVPVSSNFSVLTAQMACKISLLIIHRGY KMNPPCPPFECAHMGPPFLVSSSLKDSSLHSSLRQPAFDLIQTI IVSDAAALVTSVLKSARPLRTETIISVEMNEDEDDLKFPFDPD VDEKDDNSSWNEFTAQSRITSQEFRVWMCIPMLWIDVLVDINP SVLPVSFSKVVFWARSHFSIVEPEISAEMALDVRAWLSSSATE ISSTFGWKAPTGCDDGGAGKVSKNSMEVSTMCLPLIRAFKRLT AHFIVQIGQELRKQWTWEPRMGESLILSLVDPNDNVRQFGKC ILEQVSNTRGLASGLKFLSSSTSSLSTIFLGLKHALKLVLQDS VLLKFQSLHHFFFVLRKIFEEGHLPKCDLLKSSSGHSSITMFS SQGGFLRQPQFESFDANTGCCSNIDLKLWEKFHYTLSEITWPS VKRCLQEGKTFLDYSLCQMTICIRVLEILPVVFGKVCPLLAELS GYSATTMQNVDFDKWLHDLVDWGSQKLVVIVYWKRTITCLLN LLKDCSCSGTSLTVSSSIENLISSDHLDMGLVEKVSLLCVSLS KESSRNSGKTLMSMAHFPELDSVERKSATLDIRPFPVKMDVE ILDSETIASKSKDNLIIVSDDTEKEPSVDQGLLSDFKSRQCV VVSKTGAPISDKRASQTESLKNRVSILDSSKDLLDGGSPASPK QVLDESVGKSLNSLDSKVVDGKKKESNSKFNASDLSFSQNRVG LRNKPVESSSFKNVNQASTNVVAKPTNKLKELVCDVENDPLE SSFKSGKHQQTYLTKSGPFVPKRQVIQLK SPFENRCGLHRMETGVKRFGPPKLDDWYKPILEIDYFATVGLA SSREDENRVHCKLKEVPVCFQSPEQFVSIFRPLVLEEFKAQLH SSFLEMSSWEDMYYGSLSVLSVERVDDFHLVRFVHDDNDSVTS KIFSENDLVLLTRVSPQKTPHDVHVMVGKVERRERDNNRRSSIL LIRFYLQNGSVRLNQARRNLLERSKWHATLIMSITPQLREFHA LSSLKSIPLLPILNPNVNSRGYNESREPDLGKLSQLQOQILKT SFNESQLQAISVAIGLSSSWKKDCELSLIQPPGTGKTRTIVA IVSALLATRTSPKSHLKQNYSSCINSRPKIGQSAAIARAWQDA ALARQINEDSERDKKSSSESVRARVLICAQSNAAVDELVSRI KEGLYSGDGKTYKPYLVRVGNVKTVHPNSLPFFIDTLVDHRLA EERMHLTDPKNEFCTRSSTLRSNLEKLVDRIFFEAKRANTKD GNSDPKNMLDDEVHKGDDVKLSDVELEAKLRKLYEQKKQIYRE LGAAQVQEKKSYEETKALKHKLRKSILKEAEIVVTTLSGCGGD LYGVCSESVSGFKFGNPSENTLFDVAVVIDEAAQALEPATLIPL

							QLLKSYGTRCVMVGDPKQLPATVLSNVASKFLYECSMFERLQR AGHPVVMLTKQYRMHPDICRFPSLHFYENKLLNGEEMSRSKAP FHVTGGLGPYVFYDISDGQELRGKNAGAFSLYNEHEVDAAVEL LRFFRKRYLSEFVGGRIGIITPYKSQGLLLRSQFSNAFGSSVT SDIEFNTVDGFGQGREVDILILSTVRAADSSSASSGSRSSSIGF VADVRRMNVALTRARLSLWILGNARTLQMNYNWAALVKDAKER NLVISIKKPYASMFKSMFKSSLRKNHSELQDDHLSQLKHTEK HGDTNQFVKQIGRKSRAVETKTRDIDHMAQCNAKAVARDNDTV SAKREDLQTSRRRARDQSDLPKTDHPSAAANGQSRTSKSVKSA VLGEHVLDSETRGEESGKKKFSSSNTLTDQKKDEYSKSKLDQS APLDQQKDKYSKGKSDHSGHEAGNSHKHSKFVSKGSSKSFEQ DRSLKKLK <b>GSDPSTGGSQKEQE</b> ANDQGRNPNSVGSSDALIAKR KQQREAVDAILYSSLISSKKPEPVKPAPTKRSLSPTSISAGGGI RPPKRKKVPAASSESALQDQ
Predita: Proteína não- caracterizada a LOC102616 627 isoforma X1 [Citrus sinensis]	XP_00 64880 53.1	13	26,1	9,22	79,718	MSHPQQLRRLALNQPLEPDHHESSFLSSHAKASQTSATASSTT SRCSSFASKSASYSSNQHQYSSFHHQNLFCSTCIRLNVFSTSS KRWSAWFKLHCPGSFMASQQTRLSFNMPLDIARRKKISRQQKK EELQR <b>EVSMLOK</b> MLEQEETLHEILERIHNGQDGAISIPNFLP PKVKELLAELALVEGEIKRLEGQISQLQLGLKHEQEVTKETKS KQWQLGSLGNLQGHSTYMANISSPLINKVGNEKVAFETKALHF ISKAIKGDYNLSDFSVNEKKMGNSKVVFVDQKENQFOQQQEVK FQDRVPRKSGMIKPASPLRDPRHPTPKPRERNAAEISFDLPPK SLSNSILLEESIQNWPKNLSESIMKCLNFIYVRLLRSTRAIE LEKAGPISRSMHSSITSRSFRADTSLNSKSSIVLQKDSRQQDP YGIFDMEESIPRDIGPYKNLVIFSSSSMDPKCISSSSVPLIR KLRIILMNNLQTVDLKALTYQQKLAFWINMFMNACIMHGFLQYGV PNSPEKLIALMNKATLSIGGSTINAQAIEHYILRGQESSNLKE VDQKAGEKDEKEAIVRKLYGLESTDPNVTFALCYGTRSSPAVR IYTADGVIAELEKSKLEYLQASVVVTNTRKIAFPPELLFRNMLD FAMDIDTLVEWVCHQLPTSGSLRKSMDVCFRHQGHNNKGISIT VEKIPYDFEFQYLLAI	
Predita: Proteína não- caracterizada a LOC107177 306 [Citrus sinensis]	XP_01 538644 6.1	13	41,4	9,30	31,736	MMKIPYADHFPGHITSMCKLDVIVNAIREKLTRQQLQLFK <b>DNI</b> <b>FGHFLRCR</b> SYPFSGVIVHNLRLQVSHGDGNDKDDLWFQVGDH LIRLSIGEWCLVTGLCCGEKVFLTKHKTKHRLLNKYFGGRNRD INLGQFEEIFMNLHFKTMNDTDALKIAMFYFADRVLHGRKDHC QINFNLLNEVDDINHFRSIPWGRLSWETIYKSIDNVLNGKAKK FKKASAENPLHRIEKYNFYGFTSAVHAWIFEAIEGLPLEWVEK IRRKASFIPPPKT	
Predita: Fosfolipase A1- lgamma3, cloroplástica [Citrus sinensis]	XP_00 647063 7.1	13	31,6	5,86	61,108	MAPNLLSFSSPKGVFPFLPQQYRYYNKKAKTSLLYLNNLTNVS SLNSKNLLKCSSVSNLSTPPLDETLAFDHQEEEEQEQQEEK ELHEMWKAIQGCNDWQGLLDPMNCHLRKEIIRYGEFSQACYDS FDFDPHSKYCGTCKYSAASFFKKLDMADSGYQISRYLYATSNI NLPKFFQKSRLSSVWSTYANWMGYIAVTTDEEEIKRLGRRDIV VAWRGTVTYIEWIYDLKDILHTANFGSDPSIKIELGFHDLYTK KEQSCNYCTFSAREQVLAIEIKRLIEYYEGEEISITFTGHSLGA ALAIVSAYDVAELGLNIVNDGESSSSTKKIPITVYSFAGPRVG NLKFKERCDELGVKVLRVNVHDKVPTVPGILANEKFQFQKHF EEATKFPWSYAHVGVELALDHTNSPFLKNTKDFGCAHNLEALL HLLDGYCGKENQFCLETTKRDIALVNKSCDFLKSEYEVPPHWR QDENKGMVRNTDGR <b>WVLPERPR</b> LEALPEDTAHHLQKVLKNIAN SNNNNNSNSANNSSQLEAI	
Proteína hipotética	KDO6 9165.1	13	43,5	6,07	44,885	MAGICCGVVGESEPAVSVEQSSRASRRRRLELRPFNLVADVAV LPPSENVKRKK <b>LELYTTTLTAAHARE</b> NTQNCEKSDSERGRTV	



CISIN_1g01 5135mg [Citrus sinensis]						NKEELVGNNEAADDLVNDNPKFGMTSVCGRRRDMEDTVSIIHPS FCKQNC AHFYGVFDGHGCSHVAMKCKDRLHDILREEIESCNV EESVKWKQTMQASFGKMDKEVQDWSVSSKISNCRCELQTPQCD AVGSTAVVAVVTPEKLIVSNCGDSRAVLCRNGVAVPLSNDHKP DRPDELLRIEAAGGRVIYWDGPRVLGVLAMSRAIGDNYLKPYY ISEPEVTVTERTAEDECLILASDGLWDVVSNETACSVVRTCFR AQKAAAAASPFGSPGSEVAVSGQSSDKACLDASILLLTKLALAR RSSDNVSVVVVDLRRIKSQKQGLSS
Proteína hipotética CISIN_1g01 6141mg [Citrus sinensis]	KDO70 337.1	13	33,3	9,07	43,152	MGNAVGCVSAGVKAPKKASSYGFNPFLFSSFHGRPRNALQSS SSSSRNKKQKRERIQVDEGSAITSEQALPAALPFHSDQTSSSI PFSRSTSVVHPSLGSKKQSFQORSSSARRRRSNNDPLIKRPHQLV NQEPKIESPETSHFVLVHGGGFAGWCYKTMTLTKESGFKVDA VDLTGSGVSSCDTNSITSLEQYVKPLIDTFNELGNEEKVILVG HDFGGACISYVMELEFSPKAVAKAVFIAATMLTSGQSALDTISQQ MGSNDLMQQAQIFLYANGKQNPPTSIDLDRTLRLDLFNRSAA KDVELALISMRIPIFAPVLEKLSVSDDNYSVPRFYIKTLQDC AIPVSVQEAMINSNPPELVFEIKGSDHAPFFSKPRALHRIIVE ISKITHR
Predita: Proteína de resistência à doença putativa RGA3 [Citrus sinensis]	XP_00 64925 68.1	12	38,8	7,65	109,997	MVDAIVSPLLEKLISFSVKEVTQQVKLVKGVQDEVEKLTIIHLQ MIHAVLNDAEQRQVKEKSVRLWLGRLLKDVSYDIEDVLDEWITA RRKLQMKQNGHFPQKQVCSCSPASSIGFEKIIILRPDIAVKIKE INEKLDAIATQKYIFKFVENGSNSTREPRGRAQSTSLIDEEII CGRVDEKNELLSKLLCESSDSPKGLHIISIIGMGMGKTTLAQ LACNHEEVKRKFDKILWVCVSETFEFRVAKAIVEALDGHER LGEFQSLIKHIYESVAGMCFLLVLDVWDGNYMKWEPFFHCL KNGLHRSKILVTTRKKSVAASMGSTNIISIKELTEEECRLLFN KIAFSDRPIEEREKLEQIGRKIANCKGLPLAAKIIGSLMRSK ETEEEWRRILNSGLWKVEEIEKDILSSLLSYNDLPSKVKKCF SYCAIFPKDYNIKDRILITLWMAQGYLDTEQDEEMESKGEEYF GILASRSFFQEFTKSYDNCIMQCKMHDVHDFGQFISQNECLS MEISGLNAINSFDEKVRHLLLIVGNASFPVSTCGVKMKMRSLI IDYSRYFHLYLNGKILERLFRSTSLRVLEFGDWARSLLQGP LTRIPRNIERLVHLRYLNLNSQSIKRLPDTLCELYNLQKLDIS CCCKLKELPQIGKLINMRHLLNYGTISLRYMPVGIGRLTSLR TLDEFYVSGGGIDGRKACRLESLSLELLQVCGIRRLGNVTD VGEAKRLELDKMNLSCLKLLFNKEEGDGQRRKNEDDQLLLEF LQPPPNLRKLLIGSYRGKTVFPPWMSLTNLRSLDLDCCENCE KLPLGLKLPSEKLSISFMCSVKRVDNEILGIESDHHDDSSSCS SSSVTIAFPKLSLTISWMLELEDWDYGIAKTGNAFISIMPR LSSLTFDSCPCLKALPDHFHQTTTLQEFNIGWNCGLLEKRYRK GEGEDWHKISHIPNLEIGP
Proteína hipotética CISIN_1g03 8912mg, partial [Citrus sinensis]	KDO65 488.1	11	42,6	7,55	22,753	MFRTRSIFSLPDELLSEILARVGACSLDDLLNAGLSCKLFNEI TFDKYVLRQASIEKIPAMPWHKNYSFLEKCRDSGNPEALYKQG VVEFFSYSNLEAGVAYLDIATKSGHLGASYILGVIFLCKDDED DDNESNQKGMQHLDKVYRAKRLSQCRNKLQSTQTLWKNYYLK PKLNKCPSRKNHGLKVGWPCVDDIEL
Proteína hipotética CISIN_1g03 70512mg, partial [Citrus	KDO69 816.1	11	28,2	6,10	11,327	MRKLEHGELKATFPKIVFNPSFEEDEEKCMDITTVQRSTMSRL SPEETSDLTGSEKAEPRQNPPTLPPPASVRLLTQPPPPPPPP PPSVNHPSQATLPPIR



sinensis]							
Predita: Gliceraldeid o-3-fosfato- desidrogena se GAPC1, citossólica [Citrus sinensis]	XP_00 648403 7.1	11	46,9	7,69	37,243	MAGDKKIKIGINGFGRIGRLVARVVLQRDDVELVAVNDPFIST DYMTYMFKYDSVHGQWKHNELKVKDEKTLTFGEKPVAVFGFRN PEEIPWAKTGAEYVVESTGVFTDKDKAAAHKGGAKKVVISAP SKDAPMFVVGVEKEYKPELDIVSNASCTTNCLAPLAKVIHDK FGIVEGLMTTVHSITATQKTVDGSPMKDWRGGR <b>AASFN</b> <b>IIPSSTGAAK</b> AVGKVLPALNGKLTGMSFRVPTVDVSVVDLTVR LEKEATYEEIKNAIKEESEGLKLGILGYTEEDVSTDFVGDSE SSIFDAKAGIALSKNFVKLVSWYDNEWGYSSRVIDLIVHMAKT QA	
Predita: Proteína não- caracterizad a LOC102621 728 isoforma X3 [Citrus sinensis]	XP_015 389051. 1	11	34,1	4,70	16,324	MANVESDSTPSVPKKENITPVGSKIAELNESRAELLNRIQGLK QDLQNWRSKLDTQVKIYRDELTDMMK <b>TLSEVEEQLR</b> SEFQELR STLQQQQDDVTASLRNLGLQDFSGDDKERKDDPNINGKDEEVH AIATPVEDNAKADDK	
Proteína hipotética CISIN_1g03 7790mg [Citrus sinensis]	KDO60 176.1	23	26,1	9,22	79,718	MSHPQQLRRRLALNQPLEPDHHESSFLSSHAKASQTSATASSTT SRCSSFASKSASYSSNQHQYSSFFHHQNLFCTSCIRLNVFSTSS KRWSAWFKLHCPGSFMAQQTRLSFNMLDIARRKKISRQOKK EELQR <b>EVSMLQK</b> MLEQEETLHEILERIHNGQDGAISIPNFLP PKVKELLAELALVEGEIKRLEGQISQLQLGLKHEQEVTKETKS KQWQLGSLGNLQGHSTYMANISSPLINKVGNEKVAFETKALHF ISKAIKGDYNLSDFSVNEKKMGNSKVVFVDQKENQFQQQQEVK FQDRVPRKSGMIKPASPLRDRPHPTPKPRERNAEISFDLPPK SLSNSILLEESIQNWQPNKLSSESIMKCLNFIYVRLRLTSRAIE LEKAGPISRSMHSSITSRSFRADTSLNSKSSIVLQKDSRQQDP YGIFDMEESIPRDIGPYKNLVIFSSSSMDPKCISSSSSVPLIR KLRILMNNLQTVDLKALTYQQKLAFWINMFNACIMHGFLQYGV PNSPEKLIALMNKATLSIGGSTINAQAIEHYILRGQESSNLKE VDQKAGEKDEKEAIVRKLYGLESTDPNVTFALCYGTRSSPAVR IYTADGVIAELEKSKLEYLQASVVVTNTRKIAFPPELLFRNMLD FAMDIDTLVEWVCHQLPTSGSLRKSMVDCFRHQGHNNNGKISIT VEKIPYDFEFQYLLAI	
Predita: Proteína contendo repetição pentatricope ptídeo tipo At5g04780 [Citrus sinensis]	XP_00 646774 7.1	22	48,4	6,20	105,982	MI I I K W N M K F N F F E N S L Q K N L H Q R I Y L P F K K P F S Q K T H S K Y I Q T A T I I S E N P E S T S N L N V T H D S N F N F T P T S I P Y S K L L S Q C T I S K S V N L G K E I H A H L I R F G L L K D P K N K N N L I N F Y A K L Q F F L Y A R K L V D E S P E P D L V S W S A L I S G Y A Q N G R <b>G E E A A L A F Q K</b> M H L L G L K C N E F T F P S V L K A C T S K K D L F L G L Q V H G I V V F T G F D S D E F V A N S L V V M Y A K C G N F I D S R R L F D A I P E R S V V S W N S L F S C Y V H C D F L E E A V C F F K E M V L S G I R P N E F S L S S M I N A C A G S G D S L L G R K I H G Y S I K L G Y D S D M F S A N A L V D M Y A K V G N L E D A V A V F K D I E H P D I V S W N A V I A G C V L H E H N D W A L K L F Q Q M K S S E I N P N M F T Y T S A L K A C A G M E L K E L G R Q L H C S L I K M E I K S D P I V G V L V D M Y A K C G S M D E A R M I F H L M P E K N L I A W N I V I S G H L Q N G G D M E A A S L F P W M Y R E G V G F D Q T T L S T V L K S V A S F Q A I G V C K Q V H A L S V K T A F E S D D Y I V N S L I D A Y G K C G H V E D A V Q I F K E S S A V D L V A C T S M I T A Y A Q F G L G E E A L K L Y L E M Q D R E I N P D S F V C S S L L N A C A N L S A Y E Q G K Q V H V H I I K F G F M S D T F A G N S L V N M Y A K C G S I D D A D R A F S E I P D R G I V S W S A M I G G L A Q H G R G K E A L Q M F G Q M L E D G V L P N H I T L V S V L C A C N H A G L V A E A K H H F E S M E K K F G I Q P M Q E H Y A C M I D I L G R A G K F Q	

						EAMELVDTMPFQANASVWGALLGAARIYKNVEVGQHAAEMLFA IEPEKSSTHVLLSNIYASAGMWDNVAKVRRFMKDNKLKKEPGM SWIEVKDKVYTFTVGDRSHARSKEIYAKLDEVSDLLNKAGYVP MVETDLHDVEESEKEQLLYHHSEKLAVAFGLIATPPGATIRVK KNLRICVDCHTSFEFISKIVSREIIVRDVNRFHFRNGSCSCG GYW
Predita: Provável receptor quinase inativo At2g26730 [Citrus sinensis]	XP_01 53846 36.1	16	55,1	7,87	68,470	MRGSKLFLFLEGLICIAILPRLFTGCVGGELSESESEFFKFISA VDSQNVLRIGWNGNLPHPCSYNLKGIKCNLHATSIVGIRLENM NLSGIIDAESLCKLRHLRVVSLAKNLIQGRIPNSISNCRRLTY LNLSSNLLSGAVPLALTKLKHLKTLDISNNHFAGTSPDNFKQE IKYFDKYVVTSSSEINRASTVEARGLEDTPPPSVHNMSEHGE KRHWFRNWMTIIPLAAGIGLVVLIAYCMGKKSQAQIARDREILK ALQDSPSKSPPRVMDIEEVVRPEVRRSELVFFVNEENEKFKLDDL LEATADLRSQTICSSLFMVRLKNSAVYAVKRLKKLQVSMDEFS QTMRQIGNLKHPNILLPLVCYNSTNEEKLLVYKYQNSGSLLSLL EAYIEGKRDFPWKLRLSIATGIAKGLDFIYQKSNEEKTIPHGN LKLSNILLNENEDPLISECGYSKFLDPKKTCLFSSNGYTAPEK TVSEQGDVFSFGVILLELLTGKTVEKTGIDLPKWVKAMVREEW TGEVFDKEVAKAGRQWAFPLLNVALKCVSNSPDDRPTMAEVLE R <b>IEEVVNGNDER</b> DRDHSNSSFSMESIPHDSCLLHTVIQENWD TPRSSY
Predita: Proteína rica em prolina tipo 4 [Citrus sinensis]	XP_00 648741 0.1	16	598	10,14	55,805	MRILPGSRGALVCFVLVPLFAVSLCHAKDKAVEVVGTEGACDC AQSNFKTSQAFSGLRVITIDCKSKNGEFKTRGTGELDEEGQFKV SLPEEIVEDGKLKDECYAQVHSSSATPCPAYDGLESSKIVLKT KINGKHTFGLAKKLKFSPTCASAFFWPHFKYPPLPKWSHPKF KLPHLKSFGHHFPFPFPKSFPPKFKKPLPPIPKFKKPLPPIPK IPPVPFYKPKPPIPKVIPIPIYKPKPPIPKVLPPPIPIYK <b>L</b> <b>KPPIPK</b> LLPPIPIYKPKPPIPKVLPPPIPIYKPKPPIPKVLPP PIYKPKPPIPKVLPPVPPIYKPKPPIPKLLPPIPIYKPKPPI PKLLPPIPIYKPKPPIPKVLPPPIPIYKPKPPIPKVLPPPIPI YKPKPPISKVLPPPIPIFKPKPPIPKVLPPVPTYKPKPPIPK VLPPLIPIYKPKPPIFKLLPPLPKIPFPFKKPCPLPKLPLLP KIPPKYNDHPKFGKWRPLPPLFPLFSPHP
Predita: Proteína não- caracterizada a LOC102616 407 [Citrus sinensis]	XP_00 648343 5.1	15	26,5	8,70	28,266	MMVAMVKDEWVRAAMDDSVVVELLVRLKKQTNHVVKSEAEAV AVPLRWGIRQRRSRSSRCDAVSMRRKDAADSANNMRSPTTP LSWSGGGSGGAASPSATADEETSRRHQTSAVRSKGTATNETTGN STKRSRKKKTFAQLKEEEGFL <b>ERIH</b> L <b>NK</b> ELETLRATYKIQS AKNENLKRIKLDLGLDSGKNSSSESHVDNGLASSTFPSQSAIID LPRLEYCETHEVPAHSSSLCLLPDLNMTPAEDDSASETLYGMS
Predita: beta- hexosaminidase tipo 2 [Citrus sinensis]	XP_00 649277 7.1	13	79,7	4,93	66,456	MARAIFFISLSQLCLLSLQSDPINVWPKPRIFSWPKPEATSL AAEFKIQAPMQTLSSAVDRYLKLIKSEHHHHLVRPSINISS PPLQTLNISVDNISVPLTHGVNESYSVTITSDENTAYLVASTV WGAMRGLETFSQLVWGNPSCVAVGIYVWDEPLFSHRGLLLDTS RNYEVDLILRTISAMSANKLNLFVHWHITDSHSFPLLLPSDPN LAAKGSYGEDYLYTPSDVKKIIIEYGLDYGVRVVEIDTPGHSG SWAGAHPEIVSCANKFWWPAGTKWEDRLASEPGTGQLNPLHPK TFGVMINVLNVASIFPENFFHSGGDEILPACWK <b>SDSLIQSFL</b> <b>STGGTLSEVLEK</b> FINFVFPFIVALDKTAIYWEDVILDNEIKVD PSYLYPEYTIQSWKNGTESTKKIVQAGYRVIVSSSDYYYLDL GHGGFLGNDSLYDQPPEIQKAAGGGSWCSPFKTWQTVYNYDIT EGLTEEEKELVLGGEVALWSEQADGTVLDARLWPRTSAMAEAL

							WSGNRDETGKKRYAEATDRLNEWHRMVNRGIGAEPIQPLWCL QNP GMCNTVHAYNSGDDEENVTLSTGSADFKGFADSS
Proteína hipotética CISIN_1g00 11231mg, parcial [Citrus sinensis]	KDO7 7096.1	11	57,9	5,90	64,199		DLWSGSEGGGIKIWPWEAIEKALSLKPEERHTAALIVERSYID LRSHLSVNGFSSILTSIDIKNLLSDHSRAKVWSAGFLSFALWDA RTRELLKVFNIDGQIENRVDMSELLPDFAMEDEFKTKIVTSSKK DKAQSSFGFFQSRNAIMGAADAVRRVAAKGGFGDDNRRTEAL TTSIDGMIWTGGANGLLLQWDPNGNRLQDFQYLPFAVQCCLCTF GSQIWVGYMNGIVQVLDLEGNLLGGWVAHSSPVIKMAVGAGYI FTLANHGGIRGWNVTSPGPLDSILCKELAGKEFLYTRMENLKI LAGTWNVGQGRASQDALISWLGSAAASDVGI VVVG LQEVEMGAG FLAMSAAKETVGLEGS AVGHWW LDMIGKILDDGSTFERVGSRO LAGLLIAVWVRKNLKDYGVDVAAVPCGFGRAIGNKGA VGLR VRVYDRIMCFVNCHFAAHLEAVNRRNADFDHVYRTMTFCRPSN LCSAAAAGASSVVQMLRSTNPLSGLTVEGVPELSEADMVIFLG DFNYRLDGITYDEARDFISQRCFDWLRERDQLRAEMEAGNVFQ GMREADIKFPPTYKFEEKHLAGLAGTLL
Predita: Proteína remodelador a de cromatina 24 isoforma X1 [Citrus sinensis]	XP_00 646509 0.1	11	33,1	5,70	132,717		MAEKKS KPRSLNDSHYRLQLDASPTNRSALSSFSEYEEKPSV AKHLASSKLNDNASVKRLQFSDTTRFDSTLDDKKPKVKEAEVR TNDCSVLSRDHDHVESRSVIDEEKPQKV KIEGRRRLCKVSSRD VDNTENRAVVDDDEPNFSDITDFDSPLQSKTVSTMVNIESRAVI DDGPKFSDITVFDSPPKAKTVSENDNYKGGNEIRDILNDLSAR LEILSIDKRRVPKTVDPEDDFSRLVKNGDTGQGS KGNLPEYAS AESSFSLTSDLS DSSSGVT KDNVGGV VESVADEYEEKGDDVA DEEQETENVGIGLKRNEPRWDNNLVSARES FESNLDGEEDGG SLGEVEGDEHLSRVHETKKHHQRQKKNEPKRVHDGERFNGQSF VSGGREEYDDEDDCVIVSGKLVVNRPD RRDKLNKSAHSGLVN VLDDYSDDSVLEDEGSITLSGPRSTYMLPGKIGNMLFPHQREG LRWLWSLHCQKGK GILGDDMGLGKTMQICGFLAGLFHSRLIKR ALVVAPKTL LSHWIKELTAVGLSAKIREYFGTCVKTRQYELQY VLQDKGVLLT TYDIVRNNSKSLRGSSSFISDEAGDDDAIWYMI LDEGH LIKNPSTQRAKS LLEIPS AHRIIISGTPIQNNLKE LWA LFNFCCPELLGDNKWFKEKYELPILRGNDKHALDREKRIGSAV AKELRERI QPYFLRRLKNEVFHEDDVTSSATLSKKNEMIVWLR LTSCQRQLYEAF LNSEIVLSAFDGSPLAALTILKKICDHPLLL TKRAAEDVLDGMD SMLNPEDAALAEKLAMHIADVAEKDDFQEQ HDNISCKISFILSLDKLIPEGHNVLIFSQTRKMLNLIQESIG SKGYKFLR IDGTTKASDRVKIVNDFQEGDVAPIFLLTSQVGGGL GLTLTKADRVIVVDPAWN PSTDNQSVDRAYRIGQKKDVVVYRL MTCGTVEEKIYRKQIFKGG LFKTATEHKEQIRYFSQQDLRELL SLPKQGF DVSLTQQQLHEEHGDQHNMD ESLEAHIQFLDTL GIA GVSHHSL LFSKTARVQVVQEEEEATRRKGTA FVGNSSSSYLVA RNV DGA EYAFNPRDIKLNKSSSPKNEAKLKESDIKERIKRLS QLISNKVTVERLPDKG TKLQKQIAELNSELNKIKMEKRPEPGV IDLDDVTGKLQRLFLTQQF